

**Untersuchungen zur Toleranz hoher  
Konzentrationen von  
25-Hydroxycholecalciferol beim Absetzferkel**

**Andrea Erhardt**

**München 2009**

Aus dem Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik  
Veterinärwissenschaftliches Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Geschäftsführender Vorstand:  
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. W. A. Rambeck

# Untersuchungen zur Toleranz hoher Konzentrationen von 25-Hydroxycholecalciferol beim Absetzferkel

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

**Andrea Erhardt**

aus Ulm

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun  
Berichterstatter: Prof. Dr. W. A. Rambeck  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. K. Heinritzi

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung und Problemstellung</b>	<b>12</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>14</b>
2.1 Vitamin D	14
2.1.1 Historischer Überblick	14
2.1.2 Vitamin D - Stoffwechsel	15
2.1.3 Wirkungen von Vitamin D im Organismus	18
2.1.3.1 Vitamin D - Rezeptor	18
2.1.3.2 Physiologische Zellantwort	19
2.1.4 Calcium- und Phosphor-Homöostase	20
2.1.4.1 Parathormon	20
2.1.4.2 Calcitriol	21
2.1.4.3 Calcitonin	21
2.1.4.4 Calciumresorption aus dem Darm	21
2.1.4.5 Calciumresorption aus der Niere	23
2.1.4.6 Einfluss auf den Knochenstoffwechsel	23
2.1.5 Weitere Wirkungen von Vitamin D	27
2.1.5.1 Antiproliferative Wirkung	27
2.1.5.2 Wirkung auf das Immunsystem	28
2.1.5.3 Autoimmuner Diabetes Typ I	29
2.1.5.4 Wirkung auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	29
2.1.5.5 Wirkung auf Keratinozyten	30
2.1.6 Einfluss der Vitamin D - Versorgung auf die Gesundheit	30
2.1.6.1 Unterversorgung	31
2.1.6.2 Überversorgung	35
2.2 25-Hydroxycholecalciferol	39
2.2.1 Historischer Überblick	39
2.2.2 Wirkstoff 25-Hydroxycholecalciferol	40
2.2.3 25-Hydroxycholecalciferol als möglicher Futtermittelzusatzstoff	42

2.2.3.1	Studien zum Einsatz beim Geflügel . . . . .	43
2.2.3.2	Studien zum Einsatz beim Schwein . . . . .	47
2.2.4	Weitere Anwendungsmöglichkeiten . . . . .	49
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>50</b>
3.1	Versuchstiere . . . . .	50
3.2	Versuchstierhaltung . . . . .	50
3.3	Tierfutter . . . . .	51
3.4	Versuchsaufbau . . . . .	52
3.5	Patho-histologischer Untersuchungsgang . . . . .	55
3.5.1	Einbettungsmethoden . . . . .	56
3.5.2	Anfertigung histologischer Schnitte . . . . .	57
3.5.3	Färbemethoden . . . . .	58
3.6	Bestimmung zellulärer Bestandteile des Blutes . . . . .	60
3.7	Bestimmung klinisch-chemischer Parameter im Serum . . . . .	61
3.7.1	Aspartat-Amino-Transferase (AST), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Glucose, Harnstoff . . . . .	62
3.7.2	Alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Ge- samtbilirubin, Gesamteiweiß, Albumin, Gesamtcalcium, Phosphat, Krea- tinin . . . . .	63
3.7.3	Natrium, Chlorid, Kalium . . . . .	66
3.7.4	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP) . . . . .	66
3.7.5	25-Hydroxycholecalciferol . . . . .	66
3.8	Bestimmung der Knochenparameter . . . . .	69
3.8.1	Knochenlänge, -durchmesser und -masse . . . . .	69
3.8.2	Bruchlast und Dehnung der Knochen . . . . .	69
3.8.3	Trockensubstanz der Knochen . . . . .	70
3.8.4	Veraschung der Knochen . . . . .	71
3.8.5	Calcium- und Phosphorbestimmung der Knochen . . . . .	71
3.9	Bestimmung der Organparameter . . . . .	72
3.9.1	25-Hydroxycholecalciferol . . . . .	73
3.9.2	Untersuchung des Nierenmaterials . . . . .	73
3.10	Bestimmung der Urinparameter . . . . .	74
3.10.1	Urinstick-Schnelldiagnostik und makroskopische Untersuchung . . . . .	74
3.10.2	Calcium-, Phosphor- und Kreatininbestimmung im Urin . . . . .	75
3.10.3	Mikroskopische Untersuchung des Urins . . . . .	77
3.10.4	pH-Wert-Bestimmung des Urins . . . . .	77
3.10.5	Spezifisches Gewicht des Urins . . . . .	77

3.11	Bestimmung der Kotparameter . . . . .	78
3.11.1	Optische Parameter des Kotes . . . . .	78
3.11.2	Parasitologische Untersuchung des Kotes . . . . .	78
3.12	Bestimmung der Futterparameter . . . . .	79
3.12.1	Weender-Analyse . . . . .	79
3.12.2	Calcium-, Phosphor- und Natriumgehalt des Futters . . . . .	82
3.12.3	Stärke- und Gesamtzuckergehalt des Futters . . . . .	83
3.12.4	Bestimmung der Energiedichte des Futters . . . . .	84
3.12.5	Bestimmung von 25-Hydroxycholecalciferol im Futter . . . . .	85
3.13	Statistische Auswertung . . . . .	85
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>86</b>
4.1	Gesundheitsstatus . . . . .	86
4.2	Mastleistungsparameter . . . . .	87
4.2.1	Futteraufnahme . . . . .	88
4.2.2	Lebendmasseentwicklung und Futterverwertung . . . . .	88
4.3	Patho-histologische Parameter . . . . .	90
4.3.1	Organmassen . . . . .	91
4.3.2	Makroskopische und histologische Parameter . . . . .	92
4.4	Parameter der Blutuntersuchung . . . . .	94
4.4.1	Hämatologie . . . . .	94
4.4.2	Klinisch-chemische Parameter . . . . .	98
4.4.2.1	Enzyme . . . . .	98
4.4.2.2	Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß und Albumin . . . . .	100
4.4.2.3	Mineralstoffe . . . . .	102
4.4.2.4	25-Hydroxycholecalciferol . . . . .	103
4.5	Knochenparameter . . . . .	104
4.5.1	Knochenlänge . . . . .	104
4.5.2	Knochendurchmesser . . . . .	105
4.5.3	Knochenmasse . . . . .	106
4.5.4	Bruchlast und Dehnung . . . . .	107
4.5.5	Knochenaschegehalt . . . . .	107
4.6	Organparameter . . . . .	110
4.6.1	25-Hydroxycholecalciferol . . . . .	110
4.6.1.1	Fett- und Hautgewebe . . . . .	110
4.6.1.2	Muskel- und Lebergewebe . . . . .	111
4.6.1.3	Nierengewebe . . . . .	112

4.6.2	Nierenparameter . . . . .	113
4.7	Urinparameter . . . . .	114
4.7.1	Semiquantitative Parameter . . . . .	116
4.7.2	Makroskopische Parameter . . . . .	116
4.7.3	pH-Wert . . . . .	116
4.7.4	Spezifisches Gewicht . . . . .	117
4.7.5	Mikroskopische Parameter . . . . .	117
4.7.6	Mineralstoffgehalt . . . . .	118
4.8	Parameter des Kotes . . . . .	118
4.8.1	Optische Parameter . . . . .	118
4.8.2	Parasitologische Parameter . . . . .	119
4.9	Futterparameter . . . . .	120
4.9.1	Weender-Analyse . . . . .	120
4.9.2	Stärke- und Gesamtzuckergehalt . . . . .	120
4.9.3	Energiedichte . . . . .	120
4.9.4	Mineralstoffgehalt . . . . .	121
4.9.5	25-Hydroxycholecalciferol . . . . .	122
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>123</b>
5.1	Diskussion des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung . . . . .	123
5.1.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung . . . . .	123
5.1.2	Tierfutter und Dosierung der Wirkstoffkomponenten . . . . .	124
5.1.3	Versuchsdurchführung . . . . .	125
5.1.4	Messparameter . . . . .	126
5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	126
5.2.1	Gesundheitsstatus . . . . .	126
5.2.2	Mastleistungsparameter . . . . .	128
5.2.3	Patho-histologische Parameter . . . . .	130
5.2.4	Parameter der Blutuntersuchung . . . . .	134
5.2.5	Knochenparameter . . . . .	137
5.2.6	Organparameter . . . . .	139
5.2.7	Urinparameter . . . . .	142
5.2.8	Parameter des Kotes . . . . .	143
5.2.9	Futterparameter . . . . .	144
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>148</b>



<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>150</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>172</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>173</b>
<b>Danksagung</b>	<b>175</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>177</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon, Vasopressin
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphorsäure
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance, Varianzanalyse
<b>aq</b>	aqua (in wässriger Lösung)
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>AST</b>	Aspartat-Amino-Transferase
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphorsäure
<b>BAP</b>	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CaBP</b>	Calcium-bindendes Protein
<b>Cl</b>	Chlorid
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>d</b>	Tag
<b>DBP</b>	Vitamin D-bindendes Protein
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Ery</b>	Erythrozyt
<b>FA</b>	Futteraufnahme
<b>FVW</b>	Futterverwertung
<b>GGT</b>	Gamma-Glutamyl-Transferase
<b>GLDH</b>	Glutamat-Dehydrogenase
<b>H</b>	Wasserstoff
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>I.E.</b>	Internationale Einheit
<b>i.m.</b>	intramusculär
<b>K</b>	Kalium
<b>KG</b>	Körpergewicht

<b>KM</b>	Körpermasse
<b>Krea</b>	Kreatinin
<b>LLQ</b>	below lower limit of quantification
<b>LMZ</b>	Lebendmassezunahme
<b>LMU</b>	Ludwig-Maximilians-Universität München
<b>MCH</b>	Mean corpuscular hemoglobin (Mittlerer Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten)
<b>MCHC</b>	Mean corpuscular hemoglobin concentration (Mittlere Hämoglobinkonzentration des einzelnen Erythrozyten)
<b>MCV</b>	Mean corpuscular volume (Mittleres Volumen des einzelnen Erythrozyten)
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>N</b>	Newton
<b>Na</b>	Natrium
<b>NADP</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
<b>ODF</b>	Osteoklasten-Aktivierungsfaktor
<b>P</b>	Phosphor
<b>psig</b>	m <sup>3</sup> /Std
<b>PTH</b>	Parathormon
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>TD</b>	Tibiale Dyschondroplasie
<b>Th</b>	T-Helferzelle
<b>TRAP</b>	tartrate-resistant acid phosphatase
<b>TS</b>	Trockensubstanz
<b>u</b>	unified atomic mass unit
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>US</b>	Ursprüngliche Substanz
<b>VDLUFA</b>	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
<b>VDR</b>	Vitamin D-Rezeptor
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol
<b>25(OH)D<sub>3</sub></b>	25-Hydroxycholecalciferol

# 1 Einleitung und Problemstellung

Bereits seit mehreren Jahren wird der Futtermittelzusatzstoff 25-Hydroxycholecalciferol in der Geflügelfütterung erfolgreich eingesetzt, um eine artgerechte, bedarfsdeckende Versorgung mit Vitamin D sicher zu stellen. Bei dem zu beurteilenden Futterzusatzstoff handelt es sich um einen Metaboliten von Vitamin D<sub>3</sub>, welcher im Körper physiologisch durch Hydroxylierung am C25-Atom in der Leber entsteht.

Vitamin D<sub>3</sub>, und somit auch 25-Hydroxycholecalciferol, spielen eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Calcium- und Phosphorstoffwechsels und bei Stoffwechselvorgängen des Knochens. Eine Unterversorgung hat das früher häufige Krankheitsbild einer Rachitis, bzw. Osteomalazie zur Folge, während Überdosierungen zu Intoxikationen meist in Form von Verkalkungen führen.

Grundsätzlich bedarf ein Futtermittelzusatzstoff, bevor er eine Zulassung für alle Mitgliedsstaaten der Europäischen Union erhält, der Zulassung durch die Kommission der Europäischen Behörde gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003. Vom Hersteller ist ein umfangreiches wissenschaftliches Dossier gemäß den Durchführungsbestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 429/2008 einzureichen. Die Entscheidung der Europäischen Kommission beruht vor allem auf einer Stellungnahme der Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), die zur Beurteilung der Futtermittelzusatzstoffe einen Maßnahmenkatalog („Guidelines“) festgelegt hat. Danach sind verschiedene wissenschaftliche Studien vorgeschrieben, die neben der Wirksamkeit des beantragten Zusatzstoffes und dem Ausschluss möglicher toxischer Wirkungen auch die Verträglichkeit, das heißt die Toleranz höherer Dosierungen sicherstellen sollen. Diese Untersuchungen müssen an der beabsichtigten Zieltierart durchgeführt werden. Auf Grundlage der Stellungnahme („Opinion“) der EFSA erstellt die Kommission einen Verordnungsentwurf, mit dem die Zulassung für zehn Jahre erteilt wird.

In der vorliegenden Studie sollte, wie es in den Leitlinien der EFSA gefordert wird, die Toleranz von Absetzferkeln gegenüber 5- und 10-fach erhöhter Konzentration von 25-Hydroxycholecalciferol untersucht werden. Zudem erfolgte in dieser Studie eine vergleichende Gegenüberstellung der Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> und 25-Hydroxycholecalciferol bei der Fütterung von Absetzferkeln.

Dafür wurden 48 Ferkel in vier Gruppen eingeteilt und über einen Zeitraum von 42 Tagen mit

den zu vergleichenden Substanzen und zu untersuchenden Dosierungen gefüttert. Durch regelmäßige Allgemeinuntersuchungen sollte das Wohlbefinden der Tiere sichergestellt werden. Die Beurteilung der Toleranz sollte im Anschluss durch eine pathologische Untersuchung aller Tiere erfolgen, die mögliche Verkalkungen der verschiedenen Gewebe oder andere unerwünschte Wirkungen der Testsubstanz aufzeigen sollte. Zudem wurde der Einfluss der Substanzen im Organismus durch die Bestimmung der 25-Hydroxycholecalciferolgehalte im Blutplasma und in den verschiedenen Geweben, allen voran der Niere, sowie durch Ermittlung verschiedener Zielparameter, vor allem des Knochenstoffwechsels evaluiert. Die Wirkung auf den Knochen sollte durch physikalische Parameter des Knochenbaus, wie Knochenmasse, -länge und -durchmesser, Knochenbruchlast und -dehnung, sowie durch chemische Parameter der Knochenzusammensetzung, wie Mineralstoffgehalt der Knochenasche, und Parameter des Knochenstoffwechsels, wie der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase im Blutserum, untersucht werden. Des Weiteren sollten verschiedene Leistungsparameter der Tiere, die Ergebnisse chemischer und hämatologischer Blutuntersuchungen, sowie Analysen von Urin- und Kotproben herangezogen werden, um Aussagen über die Toleranz von 25-Hydroxycholecalciferol bei Absetzferkeln treffen zu können.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Vitamin D

#### 2.1.1 Historischer Überblick

Schon im 17. Jahrhundert legte Glisson (1650) einen Grundstein für Vitamin D Untersuchungen, als er in seinem lateinischen Werk „de Rachitide“ eine genaue klinische und anatomische Beschreibung der damals in England bei Kindern weit verbreiteten Krankheit Rachitis gab. Das Krankheitsbild der Rachitis ist deshalb bis heute auch unter dem Namen Glissonsche Krankheit bekannt (RAJAKUMAR, 2003).

Die antirachitische Wirkung von Lebertran war, obwohl die Wirkung von Vitaminen noch im Dunkeln lag, schon seit 1824 durch Beobachtungen von Scheutte bekannt (McCOLLUM, 1957). Während SNOW (1895) das fehlende Sonnenlicht bereits als möglichen Auslöser für das häufige Vorkommen von Rachitis in großen Städten zur Diskussion stellte, gelang es HULDSCHINSKY (1919) die kurative Wirkung von Sonnenlicht und künstlichem UV-Licht nachzuweisen. Unabhängig davon kam CHICK (1922) zu der erstaunlichen Entdeckung, dass sowohl UV-Licht, als auch Fisch-Lebertran prophylaktisch gegen Rachitis wirkten.

Der polnische Biochemiker FUNK (1912) beschäftigte sich mit der Isolierung eines Wirkstoffes gegen die Vitaminmangelkrankheit „Beri-Beri“. Im Zuge dieser Untersuchungen entdeckte er das Thiamin (heute: Vitamin B1) und kam auf Grund seiner Befunde zu der Annahme, dass alle lebensnotwendigen Stoffe eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe enthielten. Er prägte deshalb den Begriff „Vitamin“ (aus lat. *vita* für Leben und *amin* für stickstoffhaltig).

Zur besseren Einordnung führten McCOLLUM und DAVIS (1913) daraufhin die Bezeichnung der Vitamine mit großen Buchstaben des Alphabets ein. Noch kurz zuvor bezeichnete HOPKINS (1912) Bestandteile der Nahrung, die in synthetischen Diäten fehlten, als „accessory food factors“.

OSBORNE und MENDEL (1913) vertraten die Ansicht, dass sie mit dem fettlöslichen Stoff, den sie Vitamin A nannten und aus Lebertran isolierten, Xerophthalmie und Rachitis heilen könnten. In diesem Zusammenhang stehen auch die Untersuchungen von MELLANBY (1919), der davon überzeugt war, dass Rachitis bei Hunden durch ein Ernährungsdefizit aus-

gelöst werden kann. Er zeigte anhand von Experimenten, dass diese durch die Verfütterung von Lebertran verhindert werden konnte und hielt das in Lebertran entdeckte Vitamin A für den auslösenden Faktor.

Erst McCOLLUM et al. (1922) konnten zeigen, dass zwei verschiedene Stoffe im Lebertran vorhanden sein mussten, von denen einer nach Oxidation und Erhitzung keine Wirkung mehr gegen Xerophthalmie zeigte. Seine antirachitische Wirkung hatte der Faktor allerdings noch nicht verloren und sie nannten ihn als viertes gefundenes Vitamin „Vitamin D“.

1924 entdeckten STEENBOCK und BLACK, dass sie die calcifizierenden und wachstumsfördernden Eigenschaften von Nahrungsmitteln durch eine Bestrahlung verbessern konnten. Diese Erkenntnis führte zur Entdeckung des Cholecalciferols (Vitamin D<sub>3</sub>), welches von WINDAUS et al. (1936) isoliert und dessen Struktur aufgeklärt wurde.

Nachdem es NORMAN und DELUCA (1963) gelungen war, radioaktiv markiertes Vitamin D herzustellen, kamen dieselben Wissenschaftler 1966 zu der Erkenntnis, dass Vitamin D im Körper erst umgesetzt werden muss, damit das eigentlich biologisch wirksame Substrat entsteht. In kurzer Zeit entdeckten PONCHON et al. (1969) das durch Hydroxylierung entstandene 25(OH)D<sub>3</sub> und HOLICK et al. (1971) den biologisch aktiven Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass Vitamin D neben den klassischen Zielorganen (Knochen, Niere und Darm) auch einen Einfluss auf andere Organsysteme ausübt. So ist heute neben der Calcium- und Phosphor-Homöostase, dem Knochenumbau und dem Einfluss von Vitamin D auf die Muskelgesundheit, auch die Immunmodulation zum Schutz vor autoimmunen Krankheiten und der Schutz von Zellen vor Entartung (Krebs) bekannt.

Bereits in den 60er Jahren deutete sich jedoch an, dass Vitamin D<sub>3</sub> im Gegensatz zu seinem bis heute geführten Namen kein echtes Vitamin, sondern ein Pro-Steroidhormon darstellt (u.a. COATES und HOLDSWORTH (1961), MORII und DELUCA (1967), FRASER und KODICEK (1970)).

### 2.1.2 Vitamin D - Stoffwechsel

Wie eingangs schon erwähnt, handelt es sich bei Vitamin D eher um die Vorstufe eines Steroidhormons, als um ein Vitamin.

Die Hauptquelle für die Versorgung des menschlichen und tierischen Organismus mit Vitamin D stellt seine Produktion in der Haut unter der Wirkung von UV-Licht dar (HOLICK, 2002). Vitamine sind definiert als Stoffe, die nur in Mikromengen als Nahrungsbestandteil benötigt werden, um Stoffwechselfunktionen aufrecht zu erhalten. Aus diesem Grund ist die Bezeichnung als Vitamin in diesem Fall nur begrenzt zutreffend. Vitamin D ist das einzige Vitamin,

welches der menschliche und tierische Organismus aus seiner Vorstufe selbst synthetisieren kann (RAMBECK, 1997).

In der Nahrung kommt Vitamin D in Pflanzen und Mikroorganismen als Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>), weit häufiger aber als dessen Vorstufe Ergosterol vor. Ergocalciferol entsteht durch Spaltung des Provitamins Ergosterol, wobei diese Reaktion ebenfalls durch die UV-Strahlung des Sonnenlichts katalysiert wird. Vitamin D<sub>2</sub> unterscheidet sich von Vitamin D<sub>3</sub> lediglich in einer Seitenkette; es hat am Kohlenstoff C-24 zusätzlich eine Methylgruppe und eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23.

Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) und seine Vorstufe 7-Dehydrocholesterol sind fast ausschließlich in tierischen Geweben anzutreffen. Besonders reiche Vitamin D<sub>3</sub>-Quellen sind Fischleberöle, Milchprodukte und Eier.

Für Vitamin D ist neben der Mengenangabe in  $\mu\text{g}$  auch noch die Angabe in *I.E.* definiert. Dabei entsprechen 40 *I.E.* Vitamin D<sub>3</sub> bzw. Vitamin D<sub>2</sub> einem Gewicht von 1  $\mu\text{g}$  (STANGL, 2008).

7-Dehydrocholesterol (Provitamin D<sub>3</sub>) kann im Organismus (Leber) aus Squalen synthetisiert werden. Diese 7-Dehydrocholesterolemoleküle werden in der Haut abgelagert und absorbieren dort die Energie der auftreffenden UV-Strahlen (285-315 nm), welche zum Aufbrechen des B-Ringes benötigt werden. Dies führt zur Bildung von Prävitamin D<sub>3</sub> (HOLICK et al., 1995). Prävitamin D<sub>3</sub> liegt in seiner Molekularstruktur in zwei Stereoisomeren vor, die als cis- und trans-Isomere bezeichnet werden. Allein die cis-Form kann in das eigentliche Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) umgewandelt werden und wird wegen ihrer thermodynamischen Labilität zwischen den Phospholipidschichten der Haut stabilisiert. Nach der Umsetzung zu Cholecalciferol ist dessen Struktur mit der Lagerung in der Membran nicht mehr kompatibel und wird in den extrazellulären Raum abgestoßen (TIAN et al., 1994).

Der Hauptspeicher für Vitamin D bei Menschen und Tieren ist das Fettgewebe und die Muskulatur (MAWER et al., 1972). Cholecalciferol muss zur Umwandlung in die biologisch aktive Form in Leber und Niere hydroxyliert werden.

Vitamin D aus der Haut oder mit der Nahrung aufgenommen, wird im Blut an das Vitamin D-Bindungsprotein gebunden und zur Leber transportiert. Dort findet mit Hilfe von NADPH+H<sup>+</sup>, O<sub>2</sub> und der in Mikrosomen befindlichen Calciferol-25-Hydroxylase eine Hydroxylierung am C-25-Atom statt, wobei das 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) entsteht. Dieses stellt nur das Vorläufermolekül des aktiven Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dar, da es noch keine physiologische Funktion besitzt (DELUCA et al., 1990).

25(OH)D<sub>3</sub> verlässt die Leber und gelangt, ebenfalls wieder an das Vitamin D-Bindungsprotein gekoppelt, über das Blut zu den Nieren, wo es durch zwei mitochondriale Enzyme, die



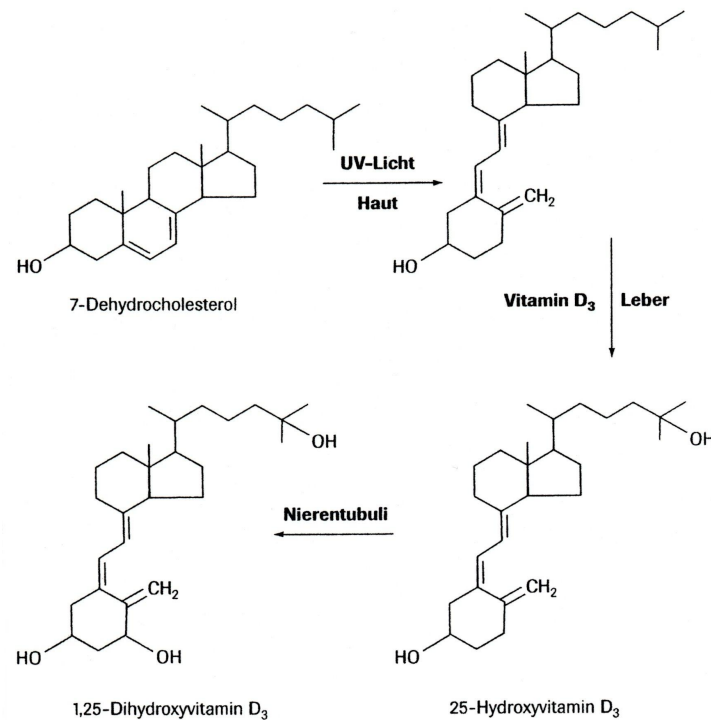


Abbildung 2.1: Photochemische und metabolische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol zu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (KOLB, 1998)

25(OH)D-1 $\alpha$ -Hydroxylase und die 25(OH)D-24-Hydroxylase zur biologisch aktiven Form 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D oder zu 24,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D metabolisiert wird, wobei die Funktion des letzteren noch nicht endgültig geklärt werden konnte.

Hohe Dosen von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induzieren die Bildung der 25(OH)D-24-Hydroxylase (DELUCA, 1981). Aus 25(OH)D<sub>3</sub> entsteht dann vermehrt der Vitamin D-Metabolit 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die Hydroxylierung zum 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> einen Aktivierungs- und keinen Abbauschritt darstellen könnte. Diese Annahme beruht vor allem auf der Tatsache, dass diese Substanz Knorpelzellen vom Huhn in vitro stimulieren kann (BINDERMAN und SÖMJEN, 1984).

RAMBECK und ZUCKER (1985) wiesen im Falle einer Kombination von 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> eine synergistische Wirkung auf die Wirkung des duodenalen Calcium-bindenden Proteins bei rachitischen Kücken und auf das Eischalengewicht Japanischer Wachteln nach.

Mehr zum Vitamin D-Metaboliten 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> siehe auch Kapitel 2.1.4.6 und 2.2.2.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Metabolisierungsprozesse nicht nur in der Leber und den Nieren stattfinden, sondern auch in anderen Organen. So besitzen Lunge, Darm und

Nieren C-25-Hydroxylierungskapazität (TUCKER et al., 1973), während Keratinozyten (BIKLE et al., 1986), die Prostata (SCHWARTZ et al., 1998) und aktivierte Makrophagen, besonders im Knochenmark, (REICHEL und NORMAN, 1989)  $1\alpha$ -Hydroxylaseaktivität besitzen.

Den stimulierenden Einfluss von Vitamin C auf die Hydroxylierung zum aktiven  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konnten WEISER et al. und SERGEEV et al. 1988 nachweisen.

## 2.1.3 Wirkungen von Vitamin D im Organismus

### 2.1.3.1 Vitamin D - Rezeptor

Die Wirkungen von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  werden vor allem durch ein nukleares Rezeptormolekül vermittelt. Dieses kontrolliert die Transkription der Gene, welche die Funktion von Vitamin D an den Zielzellen vermitteln (HAUSSLER et al., 1988).

Die Regulation der genetischen Transkription ist von MINGHETTI und NORMAN (1988) für über 60 Gene beschrieben worden, die damit direkt oder indirekt in die Calcium- und Phosphor-Homöostase eingreifen.

Der Vitamin D-Rezeptor (VDR), mit einem Molekulargewicht zwischen 60 und 70 Kilodalton, bindet  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit einer höheren Spezifität als andere Vitamin D-Metaboliten, wie z.B.  $25(\text{OH})\text{D}_3$  oder Vitamin  $\text{D}_3$  (PIKE, 1984).

Diese Spezifität verhält sich umgekehrt zu der des Serum-Transportproteins, welches  $25(\text{OH})\text{D}_3$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  fester bindet als  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Dieser Sachverhalt erlaubt den intrazellulären Rezeptoren  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Vitamin D-Zielzellen zurückzuhalten und zu konzentrieren (MANOLAGAS und DEFTOS, 1981). Die Rezeptoren treten sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern fast aller kerntragenden Zellen des Körpers auf, die somit zu potentiellen Zielzellen werden.

An das Rezeptorprotein gekoppelt, gelangt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den jeweiligen Zellkern, wo es durch die DNA-bindende Domäne des Vitamin D-Rezeptors an die Promotorregion des chromosomalen DNA-Stranges anknüpft (NORMAN et al., 1992). Durch den Komplex mit dem Rezeptor wird wie bei den Steroidhormonen die Transkription spezifischer messenger-RNA induziert, welche ein spezielles Protein kodiert. Dieses wird während der anschließenden Translation in der Zelle gebildet.

Große Ähnlichkeit zu den klassischen Glucocorticoiden und Steroidhormonen hat der Mecha-

nismus, mit dem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Calcium-Homöostase regelt (FRASER, 1995).

Die Expression des CaBP, einem Vitamin D induzierten Protein zur Calciumbindung, stellt ein Beispiel für eine gut untersuchte Genregulation dar (MINGHETTI und NORMAN, 1988). Zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase wird Calbindin hauptsächlich im Darm und den Nieren exprimiert, wo es vor allem dem Calciumtransport dient. Dabei stellt es das Transportmittel für Calcium durch die Zelle bis hin zur Basolateralmembran dar, von wo es mittels einer Calciumpumpe aktiv aus der Zelle geschleust wird (CHRISTAKOS et al., 2003). Weitere Wirkungen sind zum einen die Steuerung der Insulinfreisetzung aus den Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas über die intrazelluläre Calciummenge (SOOY et al., 1999) und zum anderen der Schutz der Zellen vor apoptotischem Zelltod durch die puffernde Wirkung von Calcium (GUO et al., 1998). Alles in allem kann Calbindin der Schutz vor zellulären Beschädigungen zugesprochen werden.

### 2.1.3.2 Physiologische Zellantwort

Vitamin D wirkt jedoch nicht nur auf dem oben beschriebenen genomischen Weg, sondern ist auch in der Lage auf physiologischem Weg direkt eine Wirkung zu erzielen. Diese durch die sogenannten „rapid responses“ ausgelösten Zellantworten rufen im Gegensatz zum genomischen Weg eine noch schnellere Wirkung hervor. Genauer gesagt, sind die „rapid responses“ schon nach wenigen Sekunden bis Minuten messbar, während eine Zellantwort mit Hilfe der Transkription bestimmter Proteine frühestens nach 60 Minuten zu erwarten ist (NORMAN et al., 1992).

Ein gut untersuchtes Beispiel für eine schnelle Zellantwort stellt die Stimulation der Calciumaufnahme aus dem Darm dar, auch Transcaltachia genannt (NEMERE und NORMAN, 1988). Hierbei kommt es durch Bindung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an einen zellständigen Rezeptor zur Freisetzung von secondmessenger-Botenstoffen, welche die Regulation von Zellfunktionen vermitteln (NORMAN et al., 1999).

Ebenfalls zu den „rapid responses“ zählt die Aktivierung der Calciumkanäle in der Darmwand, die eine gesteigerte Calciumabsorption aus dem Nahrungsbrei zur Folge haben.

### 2.1.4 Calcium- und Phosphor-Homöostase

Der Spiegel an extrazellulären Calcium- und Phosphorionen wird in Säugetieren von homöostatischen Mechanismen, welche die Nebenschilddrüsen, die Calcitonin-sezernierenden C-Zellen der Schilddrüse, die Nieren, den Knochen und das Intestinum einschließen, überwacht und reguliert (BROWN, 1991; BRINGHURST et al., 1998). Diese Mineralien werden in Darm und Niere verstärkt aufgenommen bzw. rückresorbiert, während sie in den als Speicher dienenden Knochen eingelagert bzw. aus diesen freigesetzt werden. Die Regulation erfolgt über die Hormone Calcitonin und Parathormon, sowie über das Steroidhormon Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). Die folgende Darstellung der beteiligten Hormone und Mechanismen soll einen Einblick in deren Funktionen in der Calcium- und Phosphor-Homöostase vermitteln.

#### 2.1.4.1 Parathormon

Das Parathormon (PTH) ist ein Polypeptidhormon, bestehend aus 84 Aminosäuren, das in den Hauptzellen der Nebenschilddrüse (Epithelkörperchen) gebildet wird. Es ist das wichtigste, regulierende Hormon des Calciumstoffwechsels. Die PTH-Sekretion wird über das extrazelluläre, nicht komplexierte oder an Protein gebundene Calcium und Magnesium reguliert, welche beide die Hormonfreisetzung beim Vorliegen eines hohen Blutspiegels hemmen (negative Rückkopplung) und bei niedrigen Plasmakonzentrationen stimulieren (positive Rückkopplung).

Zudem kann die Sekretion von PTH durch Katecholamine, Histamin,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , Glucocorticoesteroiden, Calcitonin, Prostaglandine, Prolactin und anderen Stoffen modifiziert werden (FISCHER und BLUM, 1980).

Niere und Skelett sind die wichtigsten Zielorgane von PTH. Effekte am Darm entfaltet das PTH vor allem indirekt via  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dessen Produktion in den Nieren primär durch PTH stimuliert wird. Dort induziert das Parathormon die Bildung des Enzyms  $1\alpha$ -Hydroxylase, während es gleichzeitig die 24-Hydroxylase hemmt. Dies hat zur Folge, dass vermehrt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und weniger  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gebildet wird. Mit diesem Mechanismus zeigt das Parathormon eine gegensätzliche Wirkung zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , das mit Induzierung der 24-Hydroxylase und Hemmung der  $1\alpha$ -Hydroxylase seine eigene Inaktivierung auslöst (ZIEROLD et al., 2003).

Des Weiteren fördert PTH die Ausscheidung von Phosphat, Natrium und Bicarbonat über den Harn und senkt die Ausscheidung von Calcium, Magnesium und Wasserstoff (MUFF et al., 1992). PTH verhindert die Phosphatreabsorption in den proximalen Tubuli und fördert die Calciumreabsorption in verschiedenen Abschnitten des Nephrons. Dies hat zur Folge, dass der Phosphatspiegel im Serum auf Grund der erhöhten Ausscheidung von Phosphat über den Urin

sinkt, weshalb mehr frei ionisiertes Calcium vorliegen kann und nicht mehr im Komplex mit Phosphat gebunden ist. In hohen Konzentrationen übt PTH einen katabolen Effekt auf das Skelett aus, indem es vor allem über eine Aktivierung der Osteoklasten die Mobilisation von Calcium und Phosphat stimuliert und dadurch eine Knochendemineralisation herbeiführt.

### 2.1.4.2 Calcitriol

Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) wird, wie oben ausgeführt, in den Mitochondrien der Niere durch Hydroxylierung gebildet. Durch sinkende Calcium- und Phosphatspiegel, sowie durch Wachstums- und Sexualhormone, wird die Bildung von Calcitriol aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  angeregt. Um unphysiologisch hohe Mengen an Calcium im Blut zu vermeiden, hemmt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sowohl die Bildung des Parathormons, als auch die  $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere (ZIEROLD et al., 2003). Die Regulation seiner eigenen Bildung übernimmt ein Feed-back-Mechanismus. Eine gewisse Menge an Calcitriol im Serum induziert die Bildung der 24-Hydroxylase in den Nieren, womit es zu einer vermehrten Bildung von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  kommt (JONES et al., 1998).

### 2.1.4.3 Calcitonin

Das Calcitonin, auch Thyreocalcitonin genannt, ist ein in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse (und teilweise der Nebenschilddrüse) aus 32 Aminosäuren gebildetes Polypeptidhormon. Es stellt den wichtigsten Antagonisten des Parathormons dar. Mit dem Überschreiten des oberen physiologischen Grenzwertes der Calciumkonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit kommt es bereits innerhalb von Minuten zu einer zusätzlichen Calcitoninfreisetzung über die ständige basale Sekretion hinaus (BLUM et al., 1994). Während es an der Niere für die vermehrte Exkretion von Calcium und Phosphat verantwortlich ist, bewirkt es am Knochen einen vermehrten Einbau dieser Mineralien. Als direkter PTH-Antagonist hemmt es auch die Osteoklastenaktivität am Knochen, was eine Hemmung der Calciumfreisetzung aus dem Knochen zur Folge hat.

### 2.1.4.4 Calciumresorption aus dem Darm

Die Calciumresorption im Darm erfolgt über zwei verschiedene Mechanismen. Ein aktiver, transzellulärer Transportprozess von der luminalen auf die basolaterale Seite fin-

det hauptsächlich im Duodenum und Jejunum statt. Ein passiver, parazellulärer Transport von Calcium verteilt sich über die gesamte Länge des Darmes (BRONNER et al., 1986).

### Der aktive Calciumtransport

Drei Phasen kennzeichnen den aktiven Calciumtransport vom Darmlumen durch die Zellen der Darmwand hindurch. In *Phase eins* kommt es zum passiven Eintritt von Calcium in die Zellen des Bürstensaums. Die *zweite Phase* beinhaltet den Calciumtransport innerhalb der Zellen und endet in der *dritten Phase* mit dem Ausstoß des Calciums in den Blutstrom auf der serosalen Seite des Darmes (BOUILLON et al., 2003).

Vitamin D<sub>3</sub> kann dabei an folgenden Punkten Einfluss nehmen (WASSERMAN, 1997) :

- Epitheliale Calciumkanäle sind membranständige Kanäle an der luminalen Darmseite und sorgen für einen unbeschränkten Calciumeinstrom in das Zellinnere. Ihre Bildung wird durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gesteigert (HOENDEROP et al., 1999).
- Der intrazelluläre Transport von Calcium findet an Calbindin gebunden statt. Zusätzlich wirkt Calbindin für die Calciumionen in der Zelle als Puffer vor apoptotischem Zelltod (GUO et al., 1998) und beschleunigt den Calciumausstoß aus der Zelle, indem es mittels Bindung die Calcium-ATPase stimuliert. Das Vitamin D macht seinen Einfluss auf das Calbindin geltend, indem das Hormon an den im Zellkern befindlichen Vitamin D-Rezeptor bindet und dadurch die DNA-bindende Domäne des VDR an die Promotorregion des chromosomalen DNA-Stranges anknüpft. Dadurch übt es einen direkten Einfluss auf die Calbindinproduktion aus (CHRISTAKOS et al., 1992; NORMAN et al., 1992).
- An der serosalen Seite (Bürstensaummembran) erfolgt der Calciumexport aus der Zelle mittels einer Ca<sup>2+</sup>-Pumpe (Ca<sup>2+</sup>-ATPase) sowie eines durch den transmembranalen Natrium-Gradienten angetriebenen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers (SCHWEIGERT, 2005), wobei der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher nicht durch das Vitamin D<sub>3</sub> zu beeinflussen ist.

Schon bei geringen Calciumkonzentrationen im Darmlumen ist dieser Transportweg allerdings gesättigt und benötigt metabolische Energie. Durch einen erhöhten Bedarf, z.B. während der Gravidität oder Laktation, wird dieser Mechanismus hochreguliert. Dagegen führt ein Anstieg des Minerals in der Nahrung zu einer Drosselung, da in diesem Falle der passive Transport entlang des Konzentrationsgefälles überwiegt. Die hormonähnliche Wirkung von Vitamin D steuert diese Regulation (SLEPCHENKO und BRONNER, 2001). Die Ausschleusung des Calciums stellt keinen limitierenden Faktor dar. Vielmehr übernimmt das Calcium-bindende Protein diese Rolle, indem der transzelluläre Calciumtransport direkt proportional mit dem Gehalt an CaBP zunimmt (BRONNER, 2003), dessen Vorkommen vollständig von der aktiven Form des Vit-

amin D abhängt.

### **Der passive Calciumtransport**

Der passive Transport erfolgt nach dem Prinzip des Konzentrationsgefälles zwischen Darmlumen und Blutplasma durch Diffusion und ist direkt abhängig vom Calciumgehalt der Nahrung und der Verweildauer des Chymus in den jeweiligen Darmabschnitten. BRONNER und PANSU (1999) untersuchten die Passagedauer des Nahrungsbreies im Darm von Ratten und beschrieben das Ileum als Ort der längsten Verweildauer mit der höchsten Calciumresorption. Limitierend hierbei ist allein das Calciumangebot im Chymus. Nur bei normalem bis hohem Calciumgehalt reicht das Konzentrationsgefälle für eine Aufnahme aus. Wenn der Calciumgehalt im Nahrungsbrei zu niedrig ist, findet die Resorption des Minerals hauptsächlich über den energieabhängigen transzellulären Weg statt (PANSU et al., 1993).

#### **2.1.4.5 Calciumresorption aus der Niere**

Calcium wird im Wesentlichen über die Nieren ausgeschieden. Das nicht an CaBP gebundene Calcium (60%) wird glomerulär filtriert. Etwa 90% der glomerulär filtrierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge wird im proximalen Tubulus und der Henle-Schleife hauptsächlich parazellulär und ohne Regulation resorbiert (LÖFFLER und BRINGELIUS-FLOHÉ, 2007). Die Regulation der Ausscheidung erfolgt im distalen Tubulus (Pars convoluta) durch Parathormon und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , welche dort die Calciumreabsorption stimulieren und so die renale Calciumausscheidung vermindern. Hierfür sind spezielle Transportmechanismen vorhanden (CRAVISO et al., 1987).

Gegenteilig verhält es sich mit der Phosphatdiurese. Während hier Parathormon die Ausscheidung fördert, verursacht  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine erhöhte Phosphatreabsorption aus dem Primärfiltrat. So bleibt die Phosphatkonzentration in Serum konstant (DELUCA, 1974).

#### **2.1.4.6 Einfluss auf den Knochenstoffwechsel**

Das Knochengewebe besteht aus drei Komponenten:

- den Knochenmineralien, die zum Großteil aus Calcium und Phosphor bestehen
- der organischen Matrix, dem so genannten Osteoid, welches sich zu 90 % aus Kollagen Typ I und zu 10 % aus anderen Proteinen zusammensetzt und

- den Knochenzellen: Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten.

Während Osteoblasten die Grundsubstanz beim Knochenbau bilden, sind die Osteoklasten für dessen Resorption zuständig. Diese Auf- und Abbauprozesse laufen ein Leben lang nebeneinander her und müssen, damit die Knochenmasse konstant bleibt, gut aufeinander abgestimmt sein. Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor und liegen einzeln in Knochenzellhöhlen, welche durch zahlreiche Kanälchen miteinander in Verbindung stehen. Osteozyten besitzen einen intensiven Stoffwechsel, der für die Erhaltung des Fließgleichgewichts der Knochenbestandteile von Bedeutung ist (MARTIN, 1993).

Osteoblasten selbst sind mesenchymalen Ursprungs und produzieren das Osteoid, die Grundsubstanz des Knochens. Daneben bilden sie aber auch Osteocalcin, welches für den Transport der Calciumionen aus dem Blutplasma in den Verkalkungsbereich des Knochens zuständig ist. Untersuchungen konnten zeigen, dass Osteoblasten über  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren verfügen (NIJWEIDE et al., 1986) und damit dem direkten Einfluss von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bezüglich ihrer Proliferation, Differenzierung und Proteinsynthese unterliegen (KANIS et al., 1988). In vivo konnte sowohl bei Tieren, als auch beim Menschen eine durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induzierte gesteigerte Osteocalcinproduktion der Osteoblasten beobachtet werden (ERBEN et al., 1997; PRICE und BAUKOL, 1981; MARKOWITZ et al., 1987).

Von den anderen Vitamin  $\text{D}_3$ -Metaboliten halten ORNOY et al. (1978) das  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für eine ausreichende Mineralisierung des Skelettes für unentbehrlich. In Studien von NAKAMURA et al. (1987) führte es in hohen Dosen zu einer Erhöhung des Knochenvolumens, ohne dabei die Entwicklung der Knochengröße zu stören.

Nach einer Langzeitfütterung von 57 Wochen untersuchten IKEZAKI et al. (1999) den Einfluss von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf Ratten und konnte bei einer Dosierung, die das Serumcalcium nicht chronisch erhöhte, eine Verdickung der Cortex am Femur feststellen.

Ein synergistischer Effekt von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  war in Studien von RAMBECK und ZUCKER (1985) anhand des Verkalkungsgrades der Epiphysenfuge der Tibia und anhand der Eischalendicke Japanischer Wachteln zu beobachten. Bezüglich des synergistischen Effektes auf die Eischalendicke dürfte allerdings zunächst eine Umwandlung des  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$  durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase der Niere nötig sein.

1988 zeigten RAMBECK et al. ebenfalls eine synergistische Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die Knochenmineralisation an verschiedenen Tiermodellen. Nach kombinierter Applikation dieser beiden Metaboliten erhöhte sich der Prozentsatz der Knochenasche am Gesamttrockengewicht stärker, als aus der Addition der Einzelwirkungen der Metaboliten zu erwarten war. Im Gegensatz zur Knochenmineralisation konnten bei der Knochenresorption keine synergistischen Effekte nachgewiesen werden.



1998 zeigten YAMAMOTO et al. einen Einfluss von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf Osteoblasten. In Versuchen mit humanen Osteoblasten konnte nachgewiesen werden, dass  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Osteoblasten den Gehalt an cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), ein „second messenger“ der Signaltransduktion, innerhalb von 5 bis 15 Minuten nach Applikation um etwa 200% erhöht.

PEDROZO et al. (1999) identifizierten einen für  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spezifischen Membranrezeptor bei Chondrozyten in der Wachstumsfuge und wiesen nach, dass er eine schnelle Aktivierung der Proteinkinase C vermittelt, die eine zentrale Bedeutung bei der Signaltransduktion und somit bei der Regulierung des zellulären Wachstums besitzt. Desweiteren wurden auf enchondralen Chondrozyten ebenso Membranrezeptoren nachgewiesen, die für  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spezifisch sind. Beide Zelltypen können Rezeptoren für beide Vitamin D-Metaboliten exprimieren, wobei ihre relative Verteilung von der Zellreifung anhängig ist. Weitere Erkenntnisse werden unter 2.1.2 und 2.2.2 ausgeführt.

Wie AMLING et al. (1999) an Knockout-Mäusen mit deaktivierten Vitamin D-Rezeptoren zeigen konnte, stimuliert das Vitamin D in erster Linie die intestinale Calciumresorption und unterstützt dadurch auf indirektem Weg die Mineralisation der Knochen. Die bei Vitamin D-Mangel vorkommende fehlende Mineralisation der Knochen wird durch unzureichende Calcium- und Phosphorspiegel im Plasma verursacht. Erst durch die Anwesenheit von Parathormon kommt es durch Mobilisation von Calcium aus den Knochen bei externer Vitamin D-Gabe zu einem Anstieg des Calciums im Serum.

Auch der Knochenabbau unterliegt dem Einfluss von Vitamin  $\text{D}_3$ -Metaboliten. Osteoklasten stammen von der hämatopoetischen Zelllinie der Monozyten- und Makrophagen ab (UDAGAWA et al., 1990). Bei der Entstehung der Osteoklasten aus dieser Zelllinie ist  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  unbedingt notwendig, wie SUDA et al. (1992) zeigen konnten: die mehrkernigen Präosteoklasten, eine Zwischenstufe in der Bildung aus Stammzellen des hämatopoetischen Systems, fusionieren nur in Anwesenheit von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und direktem Kontakt zu Osteoblasten. Die Osteoklastenformation kann auf mehreren Wegen angeregt werden, wobei sie durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  initiiert wird, welches eine Rezeptorpräsentation induziert. Parathormon, Prostaglandin E2 und Vertreter der Interleukinfamilie stellen weitere, die Knochenresorption fördernde Faktoren dar (SUDA et al., 1992).

In den Osteoblasten wird somit auf verschiedenen Wegen die Bildung eines Osteoklasten-Aktivierungsfaktors (ODF) induziert, der auf ihrer Plasmamembran präsentiert wird (SUDA et al., 1992). Aus Versuchen ging hervor, dass nur bei Zellkontakt von Osteoklastenvorstufen mit ODF-tragenden Osteoblasten eine Differenzierung zu reifen Osteoklasten erfolgen kann. Die Zielzellen von Parathormon,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , Interleukinen und weiteren Faktoren sind also nicht die Osteoklastenvorstufen, sondern stellen nach diesen Erkenntnissen die Osteoblasten

dar.

MERKE et al. vermuteten bereits 1986 ein Fehlen von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren bei Osteoklasten. Sie nahmen an, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht die Aktivität der Osteoklasten, sondern vielmehr deren Anzahl beeinflusst.

Neben der in vivo vorliegenden Funktion als „bone-mobilizing hormone“ zeigt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in vitro auch die Eigenschaften eines „bone-forming hormone“ (SUDA et al., 2003). Dabei spielt seine Konzentration eine entscheidende Rolle. Zu einer Knochenresorption in vivo kann es allerdings nur durch pharmakologische Überdosierungen oder fehlregulierten Mechanismen kommen.

In vivo verhindert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in physiologischer Konzentration die Knochenresorption durch Unterdrückung der durch Parathormon induzierten messenger-RNA-Synthese und folgender Osteoklastenaktivierung (ENDO et al., 2000).

Parathormon wirkt in hohen Mengen am Skelett primär katabol. Es führt zur Mobilisation von Calcium und Phosphat aus dem Knochen. Die Wirkung erfolgt durch Stimulation der Aktivität von Osteozyten und Osteoklasten. Das PTH fördert dabei die Umwandlung „osteogener“ in „osteolytische“ Osteozyten. Gleichzeitig sinkt die Anzahl der Osteoblasten. Unter dem Einfluss von PTH ziehen sich dann die auf der Knochenmatrix liegenden Osteoblasten zurück, wodurch den Osteoklasten der Zutritt zur Knochenmatrix geebnet wird (BLUM et al., 1994). Die Reduktion der Osteoblasten hemmt auch die Bildung von Knochenmatrix, das heisst von Kollagen und Osteocalcin. Zusätzlich zur Hemmung der Kollagensynthese wird die Knochenmatrix durch Stimulation der Kollagenasen abgebaut.

Zur Erzielung des anabolen Effekts werden nur relativ niedrige PTH-Dosen benötigt. Calcium wird nun vermehrt absorbiert und im Skelett eingelagert, die Knochenmatrix wird vermehrt gebildet und die Skelettmasse nimmt zu. Der anabole Effekt beruht vermutlich auf der beschleunigten Umwandlung von Präosteoblasten in Osteoblasten. Da dies alles die Gegenwart von Wachstumshormonen voraussetzt (HOCK und FONSECA, 1990) und PTH die Produktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Niere stimuliert, könnte der anabole Effekt auch indirekt durch diese Hormone und durch zusätzliche (parakrine) Faktoren vermittelt werden (ROSOL et al., 1991).

Im Gegensatz zu Östrogen, das sowohl die Knochenresorption als auch die Knochenformation behindert, unterdrückt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nur die Resorption, während es die Knochenformation aufrecht erhält (SHIBATE et al., 2002). In den Osteoblasten übt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zudem einen stimulierenden Einfluss auf die Synthese verschiedener Proteine aus, deren Funktionen in der Zelladhäsion und Matrixverkalkung zu suchen sind (AVIOLI, 1999).

Für die klinische Diagnostik können einige dieser Proteine als biochemische Marker des Knochenumbaus herangezogen werden.

Als Marker der Knochenresorption dienen zum Beispiel kollagene Abbauprodukte, wie Hydroxyprolin, oder TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase).

Als Marker der Knochenformation können beispielsweise Beiprodukte der Matrixsynthese, wie das Osteocalcin, oder das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) herangezogen werden. AP findet man sowohl in der Plasmamembran von Zellen der Leber, des Darmes, und der Plazenta, als auch in Osteoblasten (MOSS, 1987).

Der Alkalischen Phosphatase wird eine Rolle bei der Mineralisation neu formierter Knochen zugesprochen, indem sie durch die Freisetzung von anorganischem Phosphat in die Matrix direkt die Mineralisation katalysiert und indirekt die Hydroxyapatit-Kristallbildung stimuliert (RINGE et al., 1994).

Die positive Korrelation zwischen AP und aktiven Osteoblasten lässt darauf schließen, dass die AP als ein Marker für die Matrixformation und die beginnende Mineralisation fungiert, und nicht Zeichen einer fortschreitenden Mineralisation ist (VELDE et al., 1985).

### 2.1.5 Weitere Wirkungen von Vitamin D

Lange wurde angenommen, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  seine Wirkung lediglich im Calcium- und Phosphatstoffwechsel entfaltet. STUMPF et al. entdeckten dann 1979 mit Hilfe von radioaktiv markiertem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dass sich  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht nur in den schon bekannten Organen, wie Darm, Niere und Knochen nachweisen ließ, sondern auch in bis dahin unvermuteten Geweben, wie den Inselzellen des Pankreas, den Keratinozyten der Haut, dem Mamma- und Ovargewebe, den Epithelzellen der Nebenhoden, in manchen Nerven, Promyelozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten.

Dies legte den Grundstein für die weiteren Untersuchungen der verschiedenen Wirkungen von Vitamin  $\text{D}_3$ .

#### 2.1.5.1 Antiproliferative Wirkung

Nachdem HANCHETTE und SCHWARTZ 1992 beobachteten, dass Menschen in nördlichen Breitengraden, die auf Grund der geographischen Gegebenheiten einer geringeren UV-Licht-Bestrahlung ausgesetzt sind, ein höheres Risiko haben, an Prostatakrebs zu erkranken, kam HOLICK 2002 zu der Annahme, dass die lokale Produktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  das Zellwachstum reguliere und somit das Risiko einer Entartung herabsetze.

SCHWARTZ et al. (1998) beschreiben die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase, welche Prostatazelllinien dazu befähigt, aktives  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu produzieren. Dieses wiederum reduziert die Invasivität humaner Prostatakrebszellen, bis sie überhaupt nicht mehr vorhanden sind.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  könnte somit als Wachstum hemmendes Hormon in der Chemoprävention verwendet werden. Dagegen scheint  $25(\text{OH})\text{D}_3$  bei der Inhibition der Zellproliferation im Gegensatz zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine bis zu 30 mal geringere Aktivität zu besitzen (CHEN et al., 2000).

JOHNSON et al. (2002) fanden heraus, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Lage ist, den Zellzyklus in der G0- bzw. G1-Phase anzuhalten und damit die unkontrollierte Vermehrung von Tumorzellen zu verhindern. Des Weiteren ist  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Lage, durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration den apoptotischen Zelltod einzuleiten. Diese Eigenschaft könnte zum Einsatz in der Behandlung von Mammakarzinomen genutzt werden, um hier eine Apoptose der Tumorzellen auszulösen (SERGEEV, 2004).

Momentan ist ein alleiniger Einsatz von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aber noch nicht denkbar, da die Nebenwirkungen auf den Calcium- und Phosphorhaushalt zu groß wären. Es konnte jedoch sowohl bei in vitro (KOSHIZUKA et al., 1998; WANG et al., 2000; HERSHBERGER et al., 2001; RASSNICK et al., 2008) als auch in vivo (RASSNICK et al., 2008) durchgeführten humanmedizinischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Lage ist, die antiproliferative Wirkung der Chemotherapeutika *Cisplatin*, *Adriamycin* und *Paclitaxel* zu verstärken. Auch für andere Substanzen konnte ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden, was Anlass zu weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet gibt.

### 2.1.5.2 Wirkung auf das Immunsystem

Nach der Vorarbeit von STUMPF et al. (1979), welche das  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Promyelozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten nachweisen konnten, entdeckten MANOLAGAS et al. (1985) kurze Zeit später, dass auch B- und T-Lymphozyten, und ebenso Monozyten Vitamin D-Rezeptoren besitzen, was die immunregulatorische Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erklärt.

Das Vitamin D-Hormon macht seinen Einfluss auf das Immunsystem geltend, indem es in Th2 T-Helferzellen die Produktion von Transforming-Growth-Factor- $\beta$ 1 und Il-4 auslöst. Diese beiden Zytokine wiederum unterdrücken zum einen die  $\text{TNF}\alpha$ - und Interferon- $\gamma$ -Synthese in Th1-Zellen, und lösen zum anderen eine kaskadenartige Immunreaktion aus.

Das aktive Vitamin  $\text{D}_3$  blockiert die Aktivierung von T-Lymphozyten (LEMIRE et al., 1995). Antigenpräsentierende Dendritische Zellen sind in der Lage, T-Zellen ( $\text{CD}_4$  = Helferzellen und  $\text{CD}_8$  = Zytolytische Zellen) zu aktivieren. In vivo und in vitro Versuche konnten zeigen, dass

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> über die Vitamin D-Rezeptoren die Dendritischen Zellen in einer Art Unreifezustand verharren lässt (GRIFFIN und KUMAR, 2003).

Untersuchungen ergaben, dass 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und dessen Analoga eine immunmodellierende Potenz besitzen, ohne dabei die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf Infektionen zu beeinträchtigen. So ließen sich unter anderem autoimmune Krankheiten wie die autoimmune Encephalomyelitis (LEMIRE und ARCHER, 1991), durch Kollagen induzierte Arthritis (CANTORNA et al., 1996), Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematoses, durch *Borrelia burgdorferi* hervorgerufene rheumatoide Arthritis und Diabetes mellitus Typ I behandeln, bzw. verhindern. Doch auch hier steht einem therapeutischen Einsatz von Vitamin D-Hormon seine Auswirkungen auf den Calcium- und Phosphatstoffwechsel entgegen (MAY et al., 2004).

### 2.1.5.3 Autoimmuner Diabetes Typ I

ROTHER et al. konnten 1999 nachweisen, dass bei Mäusen die Wahrscheinlichkeit einer Diabetes-Typ-I-Erkrankung durch die Gabe von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> deutlich herabgesetzt ist. Dieser Diabetestyp ist das Resultat einer T-Zell-vermittelten autoimmun Reaktion gegen die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse. Diese autoimmune Reaktion kann durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> verhindert werden. Zusätzlich unterdrückt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, wie schon oben beschrieben, die Produktion von Zytokinen und die Reifung der Dendritischen Zellen (ZELLA und DELUCA, 2003).

### 2.1.5.4 Wirkung auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System dient der Regelung des Blutdruckes und des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes. Der am Vas afferens des Glomerulum der Niere lokalisierte juxtaglomeruläre Apparat registriert Na-Mangel, sowie Hypovolämie und Hypotonie und antwortet darauf mit der Freisetzung von Renin. Dieses baut das in der Leber synthetisierte inaktive Angiotensinogen zum ebenfalls inaktiven Angiotensin I ab. Vorwiegend in der Lunge katalysiert das Aldosterone-converting-enzyme dessen weiteren Abbau zum stark vasopressorisch wirkenden Angiotensin II. Dieses hemmt die Diurese durch Reduktion der renalen Blutzirkulation und übt über einen direkten Angriff am Myokard einen positiv inotropen Effekt auf das Herz aus. Zusätzlich stimuliert es die Synthese, vor allem aber die Freisetzung des Hormons Aldosteron in der Nebennierenrinde. Aldosteron fördert die Rückresorption von Natrium- und Chlorionen und damit auch von Wasser in den distalen Tubuli der Nieren, stimuliert die ADH-Freisetzung

(Vasopressin) aus dem Hypophysenhinterlappen und hemmt die renale Reninsekretion, womit sich der Regelkreis schließt.

Das Vitamin D-Hormon wirkt in diesem System als negativer Regulator auf die endokrine Genexpression von Renin (LI, 2003). Daraus folgt, dass zwischen der Vitamin D-Konzentration im Blut und dem Blutdruck ein inverser Zusammenhang besteht.

### 2.1.5.5 Wirkung auf Keratinozyten

Nachdem bereits STUMPF et al. 1979 das Vorkommen von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Keratinozyten der Haut nachweisen konnten, stellten SMITH et al. kurze Zeit später (1986) fest, dass Keratinozyten ebenfalls Vitamin D-Rezeptoren besitzen und dadurch befähigt sind, unter dem Einfluss von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ihr Wachstum einzuschränken und ihre Alterung zu beschleunigen. Während MACLAUGHLIN und HOLICK den Einsatz zur Behandlung der Psoriasis 1985 noch theoretisch in Erwägung ziehen, gibt es heute mehrere zugelassene Salben, Cremes, Emulsionen und Lösungen zur topischen Behandlung der Schuppenflechte, die Vitamin  $\text{D}_3$  oder ein Vitamin  $\text{D}_3$ -Analog enthalten. *Silkis®* enthält den Wirkstoff Calcitriol, während *Daivonex®*, *Psorcutan®* oder *Calcipotriol Sandoz®* als wirksame Komponente das Vitamin  $\text{D}_3$ -Analog Calcipotriol enthalten, um nur ein paar Beispiele zu nennen.

### 2.1.6 Einfluss der Vitamin D - Versorgung auf die Gesundheit

Fast alle Nutztierarten, die heute kommerziell gehalten werden, benötigen von außen zugeführtes Vitamin D, um ihren Bedarf decken zu können. Eine Supplementierung ist vor allem für folgende Indikationen unerlässlich (KOLB, 1998):

- Förderung des Wachstums, insbesondere der Entwicklung des Skeletts
- Erhaltung des Calciumbestandes bei laktierenden Rindern mit hoher Milchleistung, unter anderem zur Verhinderung einer Gebärpause
- Erhalt der Fruchtbarkeit
- Steigerung der Leistungsfähigkeit des Immunsystems, vor allem bei neugeborenen Tieren
- Bildung einer widerstandsfähigen Eischale, um Verluste während der Transporte und der

Inkubation zu verringern

- Wachstum der Feten, die schon frühzeitig in ihrer Entwicklung die aktiven Formen des Vitamin D bilden
- Verhinderung der Rachitis und Osteomalazie

Wie bereits geschildert, kann der Bedarf des Organismus an Vitamin D über die eigene Synthese nach UV-Bestrahlung der Haut oder die Versorgung über das Futter gedeckt werden. Durch unzureichende UV-Bestrahlung der Haut, einer ungenügenden Versorgung über das Futter oder einer Störung in der metabolischen Aktivierung des Vitamins, kann es zu einem Vitamin D-Mangel kommen, der die Rachitis des Jungtieres oder die Osteomalazie bei adulten Tieren nach sich zieht.

Infolge einer übermäßigen Vitamin D-Aufnahme kann es zu Vitamin D-Intoxikationen mit Calcium- und Phosphatablagerungen in Weichteilgeweben kommen. Vitamin D-Vergiftungen auf Grund exzessiver Sonneneinstrahlung sind nicht möglich.

#### 2.1.6.1 Unterversorgung

POMMER vertrat 1985 die Ansicht, dass es sich bei der Rachitis und der Osteomalazie um dieselbe Erkrankung handelt und durch Kalkablagerungen zustande kommt.

Nach dem heutigen Kenntnisstand handelt es sich bei der Rachitis um eine Vitamin D-Unterversorgung, die im Mutterleib und im Wachstum auftritt. Die Erkrankung zieht eine Wachstumsretardierung und Skelettdeformationen nach sich und kann das Risiko für eine spätere Hüftfraktur erhöhen (HOLICK, 2007). Im Erwachsenenalter kann ein Vitamin D-Defizit Osteopenie oder Osteoporose auslösen bzw. verschlimmern, Osteomalazie und Muskelschwäche verursachen, sowie das Risiko für Frakturen erhöhen. Chronischer Vitamin D-Mangel kann darüber hinaus zu Diabetes Typ I (HYPPÖNEN et al., 2001), verschiedenen Tumorerkrankungen (ALPERT und SHAIKH, 2007), rheumatoider Arthritis (MERLINO et al., 2004) und Multipler Sklerose führen (MUNGER et al., 2004).

Der 25(OH)D<sub>3</sub>-Serumspiegel gilt als bester Indikator für den Vitamin D-Status (REICHEL et al., 1989) da die hepatische 25-Hydroxylierung keiner strengen Regulierung, sondern nur einer mäßigen Produkthemmung unterliegt. Uneinigkeit herrscht nach wie vor über die Definition, ab welchen 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentrationen im Serum ein Vitamin D-Defizit vorliegt, wobei sich die meisten Experten auf Werte unter 20 ng pro ml Serum festlegen (THOMAS et al., 1998; BISCHOFF-FERRARI et al., 2006; HOLICK, 2006). DAWSON-HUGHES et al. (2005) sind

der Meinung, dass Werte von 21-29 *ng* 25-Hydroxyvitamin pro *ml* Serum kennzeichnend sind für einen relativen Vitamin D-Mangel und Werte über 30 *ng* pro *ml* Serum für eine Versorgung mit Vitamin D ausreichen. Diese Werte gelten für den Menschen.

Ohne Vitamin D können nur 10-15% des Calciums und circa 60% des Phosphats aus der Nahrung aufgenommen werden. Durch die Interaktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit dem VDR können diese Werte auf 30-40% (Ca), bzw. annähernd 80% (P) gesteigert werden (DELUCA, 2004). Die verminderte Calciumresorption im Darm führt zu einem Anstieg der Parathormonausschüttung aus der Nebenschilddrüse. Das Parathormon führt, wie bereits erläutert, zu einer erhöhten tubulären Rückresorption von Calcium in den Nieren und stimuliert diese zur Produktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Zudem aktiviert es Osteoblasten, welche ihrerseits die Umwandlung von Pre-osteoklasten in reife Osteoklasten stimulieren. Die mineralisierte Kollagenmatrix des Knochens wird daraufhin von Osteoklasten aufgelöst und somit das fehlende Calcium aus dem Knochen mobilisiert. Dauert der Vitamin D-Mangel länger an, kommt es durch die permanente, maximale Stimulierung der Nebenschilddrüse zum Krankheitsbild des sekundären Parathyreoidismus (MALABANAN et al., 1998). Die Entkalkung des Knochens hat Formveränderungen, vor allem im Bereich der Wachstumszonen sowie Knochenerweichungen, vor allem der Schädelknochen, zur Folge. Dazu trägt auch die erhöhte Phosphatausscheidung über die Nieren bei, die zu einem Phosphatmangel im Serum führt. Dieser Mechanismus wird ebenfalls durch das Parathormon ausgelöst.

Beim Adulten ist die Pathogenese identisch wie bei der Rachitis der Wachsenden, wird aber als Osteomalazie bezeichnet. Durch den bereits erfolgten Schluss der Wachstumsfugen kommt es hier neben der Knochenerweichung auch zu sekundären Ossifikationsstörungen, die zu einer Verbiegung der Knochenachsen und zu Ermüdungsfrakturen führt (HOLICK, 2005).

### **Hypovitaminose D beim Schwein**

Bei der Rachitis handelt es sich um eine mangelhafte Mineralisation jugendlicher Knochen. Dadurch kommt es zur hyperplastischen Osteodystrophia fibrosa des wachsenden Skeletts. Histologisch sind die Bildung von kalklos bleibendem Knorpel und osteoidem Gewebe im Bereich der Epiphysenfugen zu sehen (SI-KWANG, 2002). Ursache ist meist ein sehr schnelles Wachstum und eine mangelhafte Mineralstoffversorgung.

Die durch die mangelhafte Versorgung des Organismus mit Calcium und Phosphat entstehenden verschiedenen Krankheitsbilder waren in der Vergangenheit bei schnell wachsenden Jungtieren, sowie während der Gravidität und Laktation weit verbreitet. Seit der Ergänzung des Futters durch Mineralstoff- und Vitaminzusätze sind sie beim Schwein jedoch selten geworden. Überdosierungen sind heute in der Praxis dagegen viel häufiger anzutreffen, als Mangelsitua-



tionen.

Im Gegensatz zum Menschen, liegen beim Schwein andere pathophysiologische Vorgänge vor. Beim Menschen ist die physiologische Konzentration von anorganischem Phosphat im Blutplasma niedrig und es besteht ein essentieller Vitamin D-Bedarf.

Schweine sind dagegen relativ unempfindlich gegenüber Vitamin D-Mangel und sind in der Lage, Calcium und Phosphor trotz Vitamin D-Unterversorgung gut zu resorbieren, weshalb eine Vitamin D-Mangelrachitis nur sehr selten vorkommt (LAHRMANN und PLONAIT, 2004). Vereinzelt wird bei Schweinen ein vererbter Defekt des Vitamin D-Stoffwechsels beobachtet, wobei die Synthese der biologisch aktiven Form des Vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) in der Niere versagt (KAUNE und HARMEYER, 1987; CHAVEZ et al., 2003). Dadurch sind die zunächst scheinbar gesund geborenen Ferkel weitgehend unfähig, Calcium zu resorbieren, was die oben bereits geschilderten Pathomechanismen zur Folge hat.

Der Mineralstoffmangel kann auch auf ein alimentäres Calcium- und Phosphordefizit oder auf resorptionshemmendes ungespaltenes Phytin im Futter zurückzuführen sein (HEINRITZI, 2006a). Das Phytinphosphat bildet mit Calcium einen unlöslichen Komplex. Besonders Mais, Hafer und Sojaschrot gelten als bedenklich, da sie das Phytin-spaltende Enzym Phytase nicht enthalten. Deshalb wird die Phytase generell allen Schweinefuttermitteln zugesetzt.

Bei Getreidefütterung ist der Bedarf für Phosphor meist gedeckt, während für Calcium stets Zusätze erforderlich sind.

HARRISON et al. (1975) stellten in Untersuchungen mit Schweinen fest, dass das Ausmaß der Calcium-bindenden Proteine im Darm kein verlässlicher Indikator für die Gegenwart oder Abwesenheit von Rachitis darstellt.

Klinische Symptome zeigen sich durch vermehrtes Liegen, Erregung beim Auftreiben, kurze Krampfanfälle und einen Gang, der trippelnd, steif und klamm ist. Palpatorisch sind später Knochendeformationen und Auftreibungen zu fühlen.

Nicht festzustellen sind Fieber, Durchfall oder respiratorische Erkrankungen (PEPPER et al., 1978).

Die Osteomalazie steht für eine Knochenerweichung, die nach Abschluss des Knochenwachstums entsteht. Hierbei kommt es zum Umbau bereits mineralisierter Substanz (Osteoklasie) und zum Ersatz des abgebauten Materials durch kalklos bleibendes Osteoid, teilweise auch durch fibrinöses Gewebe.

Betroffen sind vor allem Muttertiere unmittelbar nach der Laktationsphase. Auslösende Faktoren stellen Trächtigkeit, Laktation, Resorptionsstörungen, sowie Calcium-, Phosphor- oder Vitamin D-Mangel dar.

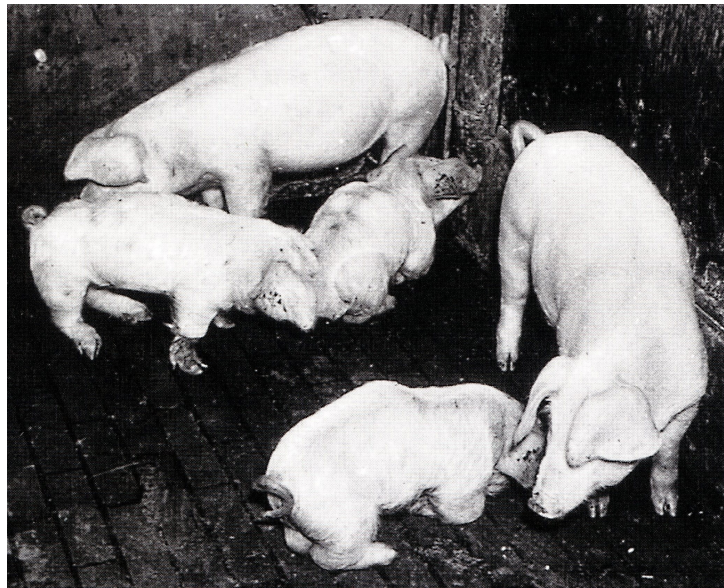


Abbildung 2.2: Läufer Schweine mit Rachitis und gesunden Wurfgeschwistern im Alter von 14 Wochen (LAHRMANN und PLONAIT, 2004)

Rachitis und Osteomalazie sind morphologisch identische Krankheiten, die sich nur histologisch voneinander abgrenzen lassen.

Eine mangelhafte Verknöcherung mit Verbiegung der langen Röhrenknochen (HEINRITZI, 2006a), sowie eine erhöhte Frakturneigung (THOMPSON und ROBINSON, 1989) ist bei beiden Erkrankungen anzutreffen, besonders betroffen sind dabei die Femurdiaphyse und der Bereich der Epiphysenfugen. Die Epiphysen und Gelenkflächen sind durch Osteoidanlagerungen vor allem am Rippenbogen, Karpus und Tarsus verdickt.

Differentialdiagnostisch lässt sich der Vitamin D-Mangel durch einen erhöhten AP-Wert (Alkalische Phosphatase) im Plasma bei gleichzeitig niedrigen Ca- und P-Werten von anderen Störungen des Mineralstoffwechsels abgrenzen (LAHRMANN und PLONAIT, 2004).

Es gilt, dass 1 I.E. Vitamin D einer Menge von  $0,025 \mu\text{g}$  Vitamin  $\text{D}_3$  bzw. Vitamin  $\text{D}_2$  entspricht (STANGL, 2008).

Therapeutisch ist darauf zu achten, dass Vitamin D bei Dauerbehandlung ab 1000 I.E./kg KM/Tag zu Hypercalcämie, ab 3000 I.E./kg KM/Tag zu Organverkalkungen, und ab 10000 I.E./kg KM/Tag zum Tod durch Nierenversagen führen kann (HEINRITZI, 2006a).

Tabelle 2.1: Richtwerte für Nährstoffgehalte in der Schweinefütterung pro Tier und Tag [T=Tier, F=Futter] (KAMPHUES et al., 2009)

	<b>Ferkel</b>			<b>Mastschweine</b>		<b>Sauen</b>	
	1.-3.Wo	4.-6.Wo	7.-10.Wo	30-60kg	60-120kg	tragend	säugend
<b>Ca</b> (g)	1,5-4/T	4-6/T	6-11/T	8,7-9,6/T	10,2-11/T	5-6,5/kg F	7-8/kg F
<b>P</b> (g)	1-1,6/T	1,7-2/T	2-3,5/T	3,8-4,1/T	4,3-3,8/T	4-5/kg F	6/kg F
<b>Vit. D</b> (I.E.)	500/kg F			150-200/kg F		500-700/T	1500/T

### 2.1.6.2 Überversorgung

Überdosierungen von Vitamin D können Schäden zur Folge haben, die in erster Linie auf einer übermäßigen Mobilisierung von Calcium und Phosphor aus den Knochen basieren (VIETH, 1990). Dadurch kann es zu Calciumablagerungen in den Arterienwänden, Nierentubuli, Gelenken und anderen Organen kommen. Eine Hypervitaminose D wird praktisch vor allem durch die Überdosierung von Vitaminpräparaten ausgelöst (SIMON, 2008).

Anhand von Grasanalysen und Fütterungsversuchen konnten ZUCKER und RAMBECK (1981) und RAMBECK (1984) nachweisen, dass Goldhafer (*Trisetum flavescens*) den hormonell aktiven Vitamin D-Metaboliten  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  enthält. Durch die vermehrte Aufnahme von Goldhafer können bei Rindern Kalzinosen auftreten.

Beim Menschen spricht man von einer Vergiftung, wenn die 25-Hydroxyvitamin D-Werte im Serum über 150 *ng/ml* liegen (HOLICK, 2007).

Bei erhöhten Vitamin D-Konzentration können auch inaktive Vorstufen des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an den Vitamin D-Rezeptor binden und so dessen Wirkungen vermitteln und die Regelungen überspringen, die sonst die Wirkungen des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  streng begrenzen (DUSSO et al., 2005).

Die Vitamin D-Intoxikation ist durch eine Hypercalcurie und Hypercalcämie gekennzeichnet (CASHMANN, 2007). Der erhöhte Vitamin D-Gehalt im Körper regt die Bildung des Calcium-bindenden Proteins (CaBP) an, was zu einer vermehrten Calcium- und Phosphorresorption aus dem Darm führt und eine Hypercalcämie und/oder eine Hyperphosphatämie zur Folge hat. Die vermehrt unkontrolliert aufgenommenen Mineralstoffe aus dem Darm können vom Organismus nicht physiologisch adäquat verstoffwechselt werden, sondern werden in Weichgeweben eingelagert, was zu einer Verkalkung (Kalzinose) führt. Dabei wird vermutet, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Gewebe eine Zelldifferenzierung zur Herstellung einer calcifizierbaren Matrix induziert.

Betroffen sind vor allem Gewebe der Aorta, des Herzens, der Nieren, der Sehnen und Bänder, des Uterus, des Darmes und der Magenschleimhaut (ALLEN und SHAH, 1992). Die Nieren werden durch die Kalkablagerungen geschädigt, was zu einer verringerten glomerulären Filtrationsrate führt. Andererseits können die Nierentubuli den Urin nicht mehr so gut konzentrieren, was vorübergehend zu einer Polyurie und einer sekundären Polydipsie führen kann. Beides führt zu einer funktionellen Niereninsuffizienz.

Weitere Symptome, insbesondere durch chronischer Überdosierung, sind:

- Anorexie und Gewichtsverlust, Erbrechen, Verstopfung, Bauchkrämpfe, Bluthochdruck, Psychosen
- Muskel- und Sehnenschmerzen, Kopfschmerzen
- bei Kindern: Wachstumsstörung, persistierende Körpertemperaturerhöhung, Erregbarkeit

Starke Überdosierungen können zum Tod führen.

Diagnostisch ist die 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration im Serum ein guter Biomarker für den Vitamin D-Status. Bei einer Hypervitaminose ist er zwei- bis fünfzehnfach erhöht gegenüber dem Normalbereich (VIETH, 1999). Ferner geht damit häufig eine Hypercalcämie einher, sowie erniedrigte Parathormon-Spiegel. Ein Frühsymptom kann eine erhöhte Calciumausscheidung im Urin sein (VIETH, 2007).

Makroskopisch können folgende Veränderungen auffallen:

- unterschiedlich starke Mineralisation der Hauptarterien, vor allem der Aorta
- unregelmäßigen Plaques auf der Oberfläche der Intima
- Verkalkungen der Herzklappen und des cardialen Endothels
- Bimssteineffekt in Teilen der Lunge
- Verkalkungen von Sehnen und Bändern
- Nierenrinde mit weißlichen Mineralisationsherden und Nierenmark mit gleichmäßigen, weißen Streifen
- Zwerchfell mit opaken und rauen Mineralisationsherden

- unterschiedlich große Herde in der Schilddrüse
- granuläre Veränderungen an zahlreichen Gelenkknorpeln
- Verdickung und Verhärtung der Gebärmutterwand durch schwerwiegende Verkalkungen

Mikroskopisch sind die Degeneration der elastischen Fasern von Intima und Media der Aorta und anderen Arterien, sowie dystrophische Verkalkungen an diesen Stellen zu erkennen. Die Kollagenfasern der Grundsubstanz können ebenfalls betroffen sein und reißen. Diese Veränderungen sind in unterschiedlichem Maße auch an den anderen Weichgeweben zu finden.

Aus den USA sind Fälle bekannt geworden, bei denen es nach dem Konsum von Milch, die mit viel zu hohen Dosen Vitamin D angereichert war, zu Symptomen einer Hypervitaminose gekommen ist (JACOBUS et al., 1992; BLANK et al., 1995; SCANLON et al., 1995).

In Deutschland wird Cholecalciferol in manchen Rodentiziden neben Vitamin K-Antagonisten als Wirkungsverstärkung hinzugegeben. In anderen Ländern werden Vitamin D-Metaboliten als gut wirksame Rodentizide gegen einige Nager verwendet (JOLLY et al., 1995).

### **Hypervitaminose D beim Schwein**

Um Mangelerkrankungen vorzubeugen, ist eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D besonders auf Grund der hohen Wachstumsgeschwindigkeit und während der Laktation erforderlich. Die Substitution durch entsprechende Futterzusätze und Injektionen birgt gleichzeitig die Gefahr einer Vergiftung. Vitamin D-Intoxikationen beim Schwein werden von mehreren Autoren beschrieben (HÄNI et al., 1975; CHINEME et al., 1976; LONG, 1984; HÜLSMANN et al., 1991; ZENTEK und MISCHOK, 1997; HEINRITZI et al., 2000)

Wie bereits in Kapitel 2.1.6.1 ausgeführt, liegt der tägliche Bedarf an Vitamin D<sub>3</sub> für Ferkel bei 500 I.E./kg Futter und für Mastschweine bei 150-200 I.E./kg Futter. Von einer Vitamin D-Vergiftung spricht man bei einer täglichen Aufnahme zwischen 10.000 und 35.000 I.E. Vitamin D/kg KM; je nach Dosis und Dauer der Überversorgung (?). Erlaubt als Zusatzstoff im Schweinefutter für Mast- und Zuchtschweine sind maximal 2000 I.E./kg Futter (ZENTEK und MISCHOK, 1997). Überhöhte Vitamin D-Gaben führen zu einem toxischen Effekt an Knochen- und Organzellen. Durch die Zerstörung der Osteozyten und der damit verbundenen Freisetzung von Calcium aus dem Knochen, sowie der erhöhten intestinalen Resorption von Calcium, kommt es zu einer Hypercalcämie.

Untersuchungen mit Hilfe von Radioisotopen zeigten, dass der Knochen die hauptsächliche Quelle für den erhöhten Calciumgehalt im Blut ist (HASCHEK et al., 1978). Der Gewebede-

generation folgt eine dystrophische Verkalkung, die sich insbesondere im Bereich der Nieren bemerkbar macht und tubuläre Resorptionsstörungen zur Folge hat. Darüber hinaus bewirkt die negative Wirkung auf das erythropoetische Gewebe eine Anämie. Pathologisch sind in fast allen Organen Verkalkungen zu finden.

Klinisch sind chronische Vergiftungen schwer zu diagnostizieren, da zunächst nur verringerte Gewichtszunahmen und eine schlechte Futterverwertung festzustellen sind. Futterverweigerung, Lahmheiten, eine kyphotische Rückenlinie und häufiges Sitzen, sowie eine auffällig Polydipsie und Polyurie sind spätere klinische Bilder.

Akute Intoxikationen sind wesentlich seltener, wobei die Symptome bereits innerhalb von wenigen Stunden auftreten können. Sie äußern sich zunächst durch Apathie, Erbrechen infolge einer hämorrhagischen Gastritis und häufiges Liegen. Es folgen Dyspnoe, Anorexie, Exsikkose, Zähneknirschen und Diarrhoe, eine auffallend kyphotische Rückenlinie, eingefallene Flanken, sowie Polyurie und Polydipsie (HEINRITZI et al., 2000). Durch eine Nekrose der Stimmbänder kommt es zur Aphonie. Der Tod erkrankter Tiere tritt binnen Stunden bis Tagen ein (HEINRITZI, 2006a).

Vitamin D-Intoxikationen können bei tragenden Sauen zu Fruchtbarkeitsstörungen in unterschiedlichen Stadien der Trächtigkeit führen. Die Geburt toter, mumifizierter oder lebensschwach geborener Ferkel, wie es bei der Parvovirose vorkommt, ist möglich (HEINRITZI, 2006d; PALZER et al., 2006).

Makroskopisch sind Verkalkungen in fast allen Organen und Geweben, eine interstitielle Nephritis, Glomerulonephritis, Tubulonephrose sowie ein katarrhalisch-hämorrhagische Gastroenteritis, interstitielle Pneumonie und Myokarddegeneration zu finden.

Diagnostisch weisen erhöhte Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Blut auf eine Nephropathie hin.

Die Vitamin D<sub>3</sub>-Intoxikation verläuft in drei Stufen (SPIRICHEV und SERGEEV, 1988). Die erste Stufe ist gekennzeichnet durch eine Hyperphosphatämie mit kaum veränderten Calcium-Serumspiegeln. Bei der zweiten Stufe liegen sowohl eine Hyperphosphatämie, als auch eine Hypercalcämie vor und die Organverkalkungen beginnen. Nach Absetzen der Vitamin D-Zufuhr beginnt Stufe 3. Hier ist der Calciumspiegel im Serum wieder normal, aber der Phosphorgehalt erniedrigt. Die Organverkalkungen bestehen fort und führen unter anderem dazu, dass die Tiere in der Entwicklung stark zurückbleiben (HEINRITZI et al., 2000).

Therapeutisch und prophylaktisch ist auf die Intoxikation kein Einfluss zu nehmen. Wichtig ist das sofortige Absetzen des Futters und eine ausreichende Wasserversorgung.

Bei parenteraler Gabe von mindestens 100 000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub> pro Tier und gleichzeitiger Gabe

von Eisen kann es bei 3-4 Tage alten Ferkeln zur Calciphylaxie kommen, indem durch das Eisen eine systemische Hypersensibilität induziert wird (PENN, 1970; HEINRITZI, 2006a). Die Folge sind Gewebsverkalkungen und dadurch bedingte Todesfälle.

Die gebräuchliche Injektionsdosis bei Ferkeln liegt bei 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, wobei für diese Behandlung keine Indikation besteht. Die üblicherweise hochkonzentrierten Präparate in der Nutztierpraxis haben leicht eine Überdosierung zur Folge (LAHRMANN und PLONAIT, 2004).

## 2.2 25-Hydroxycholecalciferol

### Synonyme

- Calcifidiol
- Calcidiol
- 25-Hydroxycholecalciferol
- 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- 25(OH)D<sub>3</sub>

25-Hydroxycholecalciferol stellt ein Zwischenprodukt in der Synthese des aktiven 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dar. Es entsteht, wie bereits in Kapitel 2.1.2 geschildert, durch Hydroxylierung von Cholecalciferol in der Leber.

### 2.2.1 Historischer Überblick

Lange wurde angenommen, dass das unveränderte Vitamin D für die metabolischen und physiologischen Wirkungen verantwortlich ist. NORMAN et al. demonstrierten 1964 die Gegenwart eines aktiven Vitamin D-Metaboliten. Es waren die Arbeiten von LUND und DELUCA, die 1966 eindeutig bewiesen, dass ein polarer Vitamin D-Metabolit möglicherweise die metabolisch aktive Form darstellt. Die Wissenschaftler konnten große Mengen dieses Metaboliten in Knochen, Leber und Blutserum von Ratten nachweisen. Durch Bestimmung der biologischen Aktivität war erwiesen, dass es mindestens so aktiv ist, wie Vitamin D selbst. Nach Gabe physiologischer Dosen von Vitamin D war dies der vorherrschende Vitamin D-Metabolit in den Zielzellen von Intestinum und Knochen (DELUCA et al., 1967). Diese Versuche wurden mit

Schweinen durchgeführt, wobei der Metabolit auch im Plasma anderen Organismen nachgewiesen werden konnte. DELUCA (1967) und AVIOLI et al. (1967) erbrachten diesen Nachweis im Plasma von Menschen und DRESCHER et al. (1969) kurze Zeit später auch im Plasma von Hühnern.

Weitere Studien zeigten, dass Vitamin D in diesen Metaboliten umgewandelt wird, bevor seine stimulierende Wirkung auf die Calciumresorption in Darm beobachtet werden kann (DELUCA et al., 1967).

1968 identifizierten BLUNT et al. dann die neue Substanz als 25-Hydroxycholecalciferol und postulierten, dass sie die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> darstelle. Im darauffolgenden Jahr wurde von PONCHON et al. (1969) berichtet, dass die 25-Hydroxylierung in der Leber stattfindet, und zwar, wie von BHATTACHARYYA und DELUCA 1974 gezeigt, in den Mikrosomen.

1969 gelangen SUDA et al. die Isolierung und Identifizierung von 25-Hydroxyergocalciferol, dem entsprechenden Metaboliten von Vitamin D<sub>2</sub>.

Vor allem durch die Arbeitsgruppe um Kodicek und Norman wurde jedoch die Ansicht vertreten, dass 25(OH)D<sub>3</sub> nicht die stoffwechselwirksame Form des Vitamin D<sub>3</sub> ist. Dies führte zu Untersuchungen, an deren Ende 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> von HOLICK et al. (1971) und LAWSON et al. (1971) identifiziert werden konnte.

### 2.2.2 Wirkstoff 25-Hydroxycholecalciferol

Gleich wie das Vitamin D<sub>3</sub>, erhöht 25(OH)D<sub>3</sub> die intestinale Calciumabsorption (PHADNIS und NEMERE, 2003), fördert den intestinalen Phosphattransport und verstärkt die Resorption von Calcium aus dem Knochen (OLSON und DELUCA, 1969; TRUMMEL et al., 1969; BELL et al., 1988; BARGER-LUX et al., 1995; HEANEY et al., 1997). Dies hat einen Anstieg des Calcium- und einen Abfall des Parathormon-Spiegels im Serum zur Folge.

25(OH)D<sub>3</sub> ist der im Blutkreislauf hauptsächlich zirkulierende Vitamin D-Metabolit (ZEHN-DEK und HEWISON, 1999). Es ist daher der zweckdienlichste Indikator für die Vitamin D-Versorgung (VIETH et al., 1990). Die biologische Halbwertszeit von 25(OH)D<sub>3</sub> im Blut beträgt einen Monat (CLEMENTS et al., 1992). Nach seiner Synthese in der Leber wird die weitere Metabolisierung, streng reguliert durch das Parathormon und Calcium (SHEPARD und DELUCA, 1980), vor allem durch zwei Enzyme bestimmt, der Vitamin D-24-Hydroxylase und der 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase. Durch diese Enzyme wird 25(OH)D<sub>3</sub> weiter metabolisiert, nachdem es, ebenfalls wieder an ein Vitamin D-Bindungsprotein gekoppelt, über das Blut



von der Leber zu den Nieren transportiert wurde. Dieses Vitamin D-Bindungsprotein besitzt eine wesentlich höhere Affinität für  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , als für  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (HADDAD und WALGATE, 1976).

$24,25$ -Dihydroxycholecalciferol fungiert zum einen als negativer Regulator im Vitamin D-Metabolismus, und besitzt andererseits eine eigene Aktivität (siehe 2.1.2 und 2.1.4.6).

? identifizierten das  $24,25$ -Dihydroxycholecalciferol als sogenanntes „hatching hormone“, bzw. „Schlupfhormon“. In Untersuchungen an Hühnern der Rasse White Leghorn konnte nachgewiesen werden, dass Tiere mit einer ausschließlichen Supplementierung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zwar Eier produzierten, in denen die Embryonen physiologisch heranreiften, es allerdings nicht zum Schlupf kam. Erst nachdem die Hennen eine Kombination aus  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erhielten, konnten gleiche Schlupfergebnisse erzielt werden wie bei einer Supplementierung mit Vitamin  $\text{D}_3$ . Diese Ergebnisse konnten 1983 mit Versuchen an Japanischen Wachteln bestätigt werden ?.

In weiteren Studien am Geflügel wurde nachgewiesen, dass  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bezüglich der Knochenentwicklung und der Frakturheilung in physiologischen Dosen einen essentiellen Vitamin  $\text{D}_3$ -Metaboliten darstellt (?) und in Kombination mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gute Resultate bei der Heilung von Tibiafrakturen erzielt.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stellt das aktive Hormon dar. VIETH et al. (1990) versuchten in ihren Experimenten mit Ratten eine Beziehung zwischen der Gabe von  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , der Aktivität der renalen 1-Hydroxylase und der Produktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  herzustellen und fanden heraus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität, der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration und der verabreichten Dosis an  $25(\text{OH})\text{D}_3$  besteht.

Auch in Futtermitteln sind, neben Vitamin D, Spuren von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  enthalten, wobei deren Gehalte stark schwanken. Die Werte in den Nahrungsmitteln Milch und Fisch sind typischerweise niedrig, in Fleisch und Innereien etwas höher und mit die höchsten Mengen befinden sich im Eigelb (OVESEN et al., 2003).

$25(\text{OH})\text{D}_3$  wird besser und schneller absorbiert als natives Vitamin D. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Vitamin D vor allem in die Lymphe absorbiert wird (THOMPSON et al., 1966; BLOMSTRAND und FORSGREN, 1967), wohingegen  $25(\text{OH})\text{D}_3$  in physiologischen Konzentrationen als stärker polarer Metabolit schneller und effektiver absorbiert wird. Dies erfolgt auf direktem Weg aus dem proximalen Jejunum in die Pfortader und geschieht unabhängig von der Fettresorption (NECHAMA et al., 1977; MAISLOS et al., 1981; SITRIN et al., 1982).

$25(\text{OH})\text{D}_3$  weist eine zum Teil stärkere Vitamin D-Aktivität auf, als Vitamin  $\text{D}_3$ , wobei die höhere Wirkstärke vom bewerteten Kriterium und der verwendeten Dosis abhängt. Aus diesem Grund

ist es nicht möglich, eine Angabe in Internationalen Einheiten (*I.E.*) Vitamin D zu geben, weshalb die Mengenangabe in  $\mu\text{g}$  25(OH) $\text{D}_3$  stattfindet. Dabei entsprechen 1  $\mu\text{g}$  25(OH) $\text{D}_3$  etwa 40-80 *I.E.* Vitamin  $\text{D}_3$ , je nach Tierart und Wirkkriterium.

So konnte in mehreren Versuchen mit Ratten nachgewiesen werden, dass oral oder parenteral verabreichtes 25(OH) $\text{D}_3$  (BLUNT et al., 1968b) und 25(OH) $\text{D}_2$  (SUDA et al., 1970) um den Faktor 1,3-1,5 bzw. 2 (MIRAVET et al., 1976) aktiver, effektiver und schneller einsetzte als Vitamin  $\text{D}_3$ . Untersuchte Parameter waren dabei die Calcifikation, die intestinale Calciumresorption und die Mobilisation von Calcium aus den Knochen.

### 2.2.3 25-Hydroxycholecalciferol als möglicher Futtermittelzusatzstoff

Wie bereits unter 2.1.6 dargestellt, benötigen kommerziell gehaltene Tierarten von außen zugeführtes Vitamin D, um ihren Bedarf decken zu können. Vitamin D und seine verschiedenen Stoffwechselprodukte sind essenzielle Mikronährstoffe für die normale Entwicklung von Mensch und Tier, wobei die beiden Substanzen Vitamin  $\text{D}_2$  und Vitamin  $\text{D}_3$  bereits zugelassene und eingesetzte Zusatzstoffe sind.

Hieraus ergeben sich eventuell mehrere Einsatzmöglichkeiten für das 25-Hydroxycholecalciferol, welches in den letzten Jahren vermehrt in den Blickpunkt der Wissenschaft gerückt ist.

Die folgenden Beispiele sollen einen kurzen Einblick in unterschiedliche Forschungsrichtungen ermöglichen.

BARNETT et al. (1982) untersuchten die biologische Aktivität verschiedener Vitamin D-Metaboliten, unter anderem auch 25(OH) $\text{D}_3$ , bei der Fütterung von Regenbogenforellen. Ein Vitamin D-Mangel induziert bei diesen Fischen einen Lordose-ähnlichen, herabhängenden Schwanz, der auf eine Muskeler schlaffung zurückzuführen ist. 25(OH) $\text{D}_3$  und 1,25(OH) $_2\text{D}_3$  besitzen bei der Regenbogenforelle zwar eine Vitamin D-Aktivität, welche aber im Vergleich zu Chole- und Ergocholecalciferol schlechtere Gewichtszunahmen nach sich zieht. Am Schlechtesten waren die Zunahmen bei den Kontrolltieren, die keinen Vitamin D-Metaboliten erhielten. Bei der Fütterung dieser Tiere ist deshalb der Einsatz von 25(OH) $\text{D}_3$  als Ersatz für Cholecalciferol nicht vorteilhaft.

Es existieren mehrere Verfahren zur Prophylaxe der hypocalcämischen Gebärpause der Milchkühe. Als praktikable Methode mit anerkannter prophylaktischer Sicherheit erwies sich die parenterale Verabreichung von 10 Mio. *I.E.* Vitamin  $\text{D}_3$  (GÜRTLER et al., 1977)

eine Woche vor dem Abkalben. Auf Grund unbefriedigender Wirkungen (JONSSON und PEHRSON, 1970; MOSDOL und SKEIE, 1978), der Gefahr einer Kalzinose durch die alljährliche Applikation (GREIG, 1963; ALLEN und DAVIS, 1981; ROSSOW et al., 1994) und der negativen Beeinflussung des Calciumhaushaltes nach Abklingen der Wirkung der Präparate (LITTLEDIKE und HORST, 1982), suchen Wissenschaftler nach neuen Methoden (ZEPERITZ und SCHWABE, 1993). Beim Einsatz des Metaboliten 25(OH)D<sub>3</sub> konnte eine überwiegend günstige prophylaktische Wirkung beobachtet werden (OLSON et al., 1973, 1974; FRANK et al., 1977; ZEPERITZ, 1994). Trotz guter Ergebnisse bei der klinischen Erprobung von Vitamin D-Metaboliten werden diese in der Praxis unter anderem wegen ihrer kurzen Wirkungsdauer zur Zeit kaum angewendet.

Eine Ausnahme bildet das synthetisch hergestellte Vitamin D<sub>3</sub>-Analog 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol. 1973 konnten HAUSSLER et al. in Versuchen mit jungen Hähnchen der Rasse White Leghorn nachweisen, dass 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol schon 2-3 Stunden nach Applikation zu einer Verdoppelung der Calciumabsorption führt und eine 10 mal höhere Aktivität in Bezug auf die Calciummobilisation aus dem Knochen und dem Anheben des Calciumspiegels im Plasma im Vergleich zu Cholecalciferol besitzt.

Es folgten mehrere Studien, die den Einsatz von 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol zur Verhinderung der Gebärpause beim Rind untersuchten. Diese Versuche führten zu der Erkenntnis, dass das Vitamin D<sub>3</sub>-Analog die Häufigkeit der Erkrankung deutlich senkte und zu einer schnellen Erhöhung des Calciumspiegels im Serum führte, ohne dabei den Vitamin D-Gehalt der Milch im Vergleich zur Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe signifikant zu erhöhen (GAST et al., 1977; SACHS et al., 1977; BAR et al., 1986). In Israel ist der Einsatz von 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol zur Verhinderung der Gebärpause des Rindes heute gängige Praxis.

### 2.2.3.1 Studien zum Einsatz beim Geflügel

MYRTLE und NORMAN (1971) zeigten in einem in vivo Versuch mit rachitischen Küken, dass 25(OH)D<sub>3</sub> annähernd doppelt so aktiv ist wie Vitamin D<sub>3</sub>. In anderen Studien mit Küken konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von 25(OH)D<sub>3</sub>, betreffend der Knochenresorption, im Vergleich zu Vitamin D<sub>3</sub> sogar vier mal so hoch war (HAUSSLER und RASMUSSEN, 1972). Diese Erkenntnisse hatten einige Untersuchungen über die Aktivität von 25(OH)D<sub>3</sub> bei Hühnern zur Folge (SOARES et al., 1995), mit dem Ergebnis, dass 25-Hydroxycholecalciferol annähernd doppelt so aktiv ist wie Vitamin D<sub>3</sub>, die Schlupfraten unter 25(OH)D<sub>3</sub> verbessert sind und das Risiko einer Intoxikation durch Gaben zu hoher Mengen der verschiedenen Metaboliten bei 25-Hydroxycholecalciferol deutlich geringer ist.

In einer Studie mit isolierten Duodenumzellen von Vitamin D-behandelten Küken wurde für

25(OH)D<sub>3</sub> belegt, dass es in Bezug auf die Stimulation der Calciumabsorption fünf bis sechs mal potenter ist, als Vitamin D<sub>3</sub> (YOSHIMOTO und NORMAN, 1986).

SUNDE (1975) untersuchte in Fütterungsexperimenten den Einfluss von 25(OH)D<sub>3</sub> auf Beinschwäche, Knochenbruchfestigkeit, Knochenasche und Gewicht und konnte aufzeigen, dass die Effektivität in Bezug auf eine verminderte Beinschwäche bei 25(OH)D<sub>3</sub> etwas besser ist, als bei Vitamin D<sub>3</sub>.

KAETZEL und SOARES (1979) fanden heraus, dass die Aktivität von 25(OH)D<sub>3</sub> 1,5 mal höher ist, als die von Vitamin D<sub>3</sub>, wenn es um die Unterstützung der Calcifizierung der Eierschalen von legereifen Wachteln geht.

Dagegen zeigten CHARLES und ERNST (1973), dass die Eiproduktion und Futterverwertung von Legehennen bei alleiniger Substitution mit 25(OH)D<sub>3</sub> abnahmen. In folgenden Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine Mischung aus 25(OH)D<sub>3</sub>, Vitamin D<sub>3</sub> und Austernkalk die Eischalenqualität deutlich verbesserte (CHARLES et al., 1978).

In mehreren ähnlichen Versuchen wurde 25(OH)D<sub>3</sub> mit Vitamin D<sub>3</sub> bei der Fütterung von Legehennen verglichen, wobei 25(OH)D<sub>3</sub> eine signifikant bessere Eischalenqualität und eine erhöhte Eischalendicke aufweisen konnte (MARRET et al., 1975; McLOUGHLIN und SOARES, 1976; SOARES et al., 1976; FRANK, 1977).

Im Gegensatz dazu fanden sich in mehreren Studien bei der Verfütterung von 25(OH)D<sub>3</sub> oder Vitamin D<sub>3</sub> keinerlei Unterschiede in Bezug auf Eischalenqualität und -stabilität (ROLAND und HARMS, 1976; COHEN et al., 1978; YANNAKOPOULOS und MORRIS, 1979; JANSSEN et al., 1981). Es ist allerdings zu beachten, dass das 25(OH)D<sub>3</sub> in diesen Studien in sehr hohen Dosen eingemischt wurde und die Rationen zusätzlich auch immer adäquate Dosen von Vitamin D<sub>3</sub> enthielten, weshalb Unterschiede schwer zu beobachten waren.

25-Hydroxycholecalciferol ist ebenfalls in der Lage, bei Überdosierungen Vergiftungen auszulösen. Warum allerdings in den Versuchen von MORRISEY et al. (1977) für 25(OH)D<sub>3</sub> ein höheres Intoxikationspotential, als für Vitamin D<sub>3</sub> ermittelt wurde, ist nicht klar, weil dies anderen Studien widerspricht (SOARES et al., 1995).

Es gibt Anzeichen dafür, dass die Aktivität des Vitamin D-Metaboliten 25(OH)D<sub>3</sub> höher ist, als bisher angenommen. In Fütterungsversuchen konnte gezeigt werden, dass 25(OH)D<sub>3</sub> einen beständigen Effekt auf eine Erhöhung des Körpergewichtes und eine Senkung der Futtermenge bei Broilern nach sich zieht (YARGER et al., 1995 a,b). Die absoluten Zahlen der positiven Effekte sind nicht sehr hoch, dafür aber der Effekt in Relation zur großen Menge jährlich produzierter Broiler und dafür verbrauchtem Futter.

Die Tibiale Dyschondroplasie (TD) kann zu Knochendeformationen und klinischer Lahmheit führen, was bei den heute im kommerziellen Bereich verwendeten Broiler-Hybriden noch immer ein kritisches Element des Wohlergehens und der Gesundheit der Tiere bedeuten kann (WHITEHEAD et al., 2004). RENNIE und WHITEHEAD (1996) konnten in verschiedenen Studien nachweisen, dass 25-Hydroxycholecalciferol in der Lage ist, das Auftreten der TD in Abwesenheit von Cholecalciferol effektiv zu senken.

FRITTS und WALDROUP (2001) zeigten in Fütterungsversuchen mit Vitamin D<sub>3</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> unter anderem, dass durch die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> signifikant höhere Körpergewichte, Calcium- und Phosphatwerte erreicht, sowie Häufigkeit und Schweregrad der Tibialen Dyschondroplasie deutlich verringert werden konnten. Diese Ergebnisse konnten von BAR et al. (2003) allerdings nicht uneingeschränkt bestätigt werden.

HEIM et al. (1990) fanden in Versuchen mit beinschwachen Truthähnen heraus, dass weder 25(OH)D<sub>3</sub> noch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> einen positiven Einfluss auf das Krankheitsbild hat. Dies deutet zum einen darauf hin, dass das Beinschwäche-Syndrom der Mastputen offensichtlich nicht auf eine Störung des Vitamin D-Stoffwechsels zurückzuführen ist und dass Vitamin D und seine Metaboliten eine unterschiedliche Wirksamkeit in Bezug auf Beinerkrankungen bei Mastküken und Truthähnen haben.

Weitere Studien verglichen direkt die Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> (KESHAVARZ, 2003; LEDWABA und ROBERSON, 2003; ATENICO et al., 2005b,a). Die unterschiedlichen und zum Teil auch widersprüchlichen Aussagen in den gemachten Beobachtungen haben verschiedene Ursachen. Dazu zählen unter anderem die Dosis des verabreichten Vitamin D-Metaboliten, die Dauer der Studien, die Bestrahlung mit UV-Licht, die Anwesenheit anderer Zusatzstoffe mit Vitamin D<sub>3</sub>-Aktivität und die Höhe der Phosphor- und Calciumsupplementierung. Dies könnte die Ursache für die differierenden Aussagen darstellen.

### **25-Hydroxycholecalciferol der Firma DSM**

Bei dem Produkt 25-Hydroxycholecalciferol der Firma DSM handelt es sich um einen Futterzusatzstoff, welcher 12,5 g 25(OH)D<sub>3</sub> pro kg enthält. Die restlichen Bestandteile sind Baumwollsamensöl (897 g/kg), Fettsäuren (40 g/kg), Kolloid-Kieselerde (30 g/kg), welches emulgierende, staub- und verklebungsschützende Funktion besitzt, sowie Butylhydroxytoluol (20 g/kg) und Zitronensäure (0,5 g/kg) als Antioxidans.

In einem Gutachten (Opinion) der EFSA (2005) über die Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit von 25-Hydroxycholecalciferol als Futterzusatzstoff für Masthühner, Masttruthühner und Legehennen wird belegt, dass durch mehrere Untersuchungen eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass 25(OH)D<sub>3</sub> die Leistung der genannten Zieltierarten mindestens genauso

wirksam optimiert wie Vitamin D<sub>3</sub>.

Zu Recht wird darin empfohlen, Höchstwerte von 100 µg 25(OH)D<sub>3</sub> pro kg Alleinfutter für Masthühner und -truthühner und 80 µg 25(OH)D<sub>3</sub> pro kg Alleinfutter für Legehennen nicht zu übersteigen, bis weitere detaillierte Informationen vorliegen .

Zudem wird vermutet, dass der Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt von Geflügelgeweben und -erzeugnissen (Eiern) durch die Supplementierung mit 25(OH)D<sub>3</sub> erheblich verringert wird (EFSA, 2005).

PHILIPPS et al. (2005) fütterten verschiedene Dosierungen des 25(OH)D<sub>3</sub> und stellten dabei fest, dass selbst hohe Dosen von 560 µg 25(OH)D<sub>3</sub> pro kg Futter, statt der empfohlenen 69 µg/kg Futter, keine negativen Effekte auf die Leistungen und Ergebnisse der Küken haben. Zudem war mit den ansteigenden 25(OH)D<sub>3</sub>-Werten (von 35, über 70,140 bis 280 µg/kg Futter) auch ein Anstieg der 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration im Plasma, ein zunehmendes Lebendmassege-  
wicht und eine höhere Phosphorverwertung verbunden.

SANTOS und SOTO-SALANOVA (2005) verzeichneten in ihrer Vergleichsfütterung zwischen 25(OH)D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub>, für den Metaboliten 25(OH)D<sub>3</sub> höhere Körpergewichte, eine verbesserte Futterverwertung, geringere Tropfverluste während der Lagerung nach der Schlachtung und stabilere Knochen im Vergleich zur Supplementierung mit Vitamin D<sub>3</sub>.

Ein weiterer Versuch wurde von PAPESOVA et al. 2008 durchgeführt, wobei auch hier 25(OH)D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> gegenüber gestellt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die mit 25(OH)D<sub>3</sub> gefütterten Tiere statistisch signifikant höhere Lebendmassegewichte, höhere Calciumwerte in der fettfreien Knochenasche und ebenfalls höhere Phosphorwerte vorweisen konnten. Andere gemessene Parameter, wie die Knochenqualität, die Futterverwertung und verschiedene hämatologische und biochemische Parameter zeigten dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zwei Firmenschriften der Firma DSM Nutritional Products Ltd. verdeutlichen die positiven Aspekte von 25(OH)D<sub>3</sub> (DSM, 2008a,b).

Allgemeine Vorteile sind die höhere Potenz und Effektivität von 25(OH)D<sub>3</sub> im Vergleich zu Vitamin D<sub>3</sub>, sowohl unter normalen Bedingungen, als auch unter Stress. Zudem trägt 25(OH)D<sub>3</sub> zu einer Maximierung der Knochenentwicklung und -dichte bei, führt zu einer Reduktion der Tibialen Dyschondroplasie und wird durch den sich vom Vitamin D<sub>3</sub> unterscheidenden Absorptionsmechanismus im Falle einer Darm- oder Lebererkrankungen nicht an der Aufnahme behindert. Auch durch erhöhte Gaben von Vitamin D<sub>3</sub> seien die durch 25(OH)D<sub>3</sub>-Anwendung erreichten statistisch signifikanten Verbesserungen nicht zu erreichen.

In Bezug auf die Eiqualität sind eine Stärkung der Eischale und eine verbesserte Schlupfrate zu verzeichnen. Des Weiteren trägt 25(OH)D<sub>3</sub> zu einer sichereren, physiologischen, embryonalen

Entwicklung bei.

Durch die Verabreichung an Küken kann eine Reduktion der angeborenen oder erworbenen Rachitis erzielt werden.

In der Fütterung von Broilern sind verbesserte Gewichtszunahmen und eine gesteigerte Futterverwertung zu verzeichnen.

Bei Legehennen wird durch die Gabe von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  eine Reduktion der Legemüdigkeit und der Legestörungen erreicht, was eine höhere Produktion von Eiern zur Folge hat.  $25(\text{OH})\text{D}_3$  stellt vor und während der Legeperiode optimale Mengen des aktiven Vitamin  $\text{D}_3$ -Metaboliten bereit.

### 2.2.3.2 Studien zum Einsatz beim Schwein

Ein Vitamin D-Mangel erhöht das Risiko von Knochenbrüchen als Folge der Osteomalazie und führt zu einer Abnahme der Muskelstärke. Deshalb ist eine ausreichende Supplementierung von Vitamin D im Fütterungsmanagement sehr wichtig. Während Vitamin  $\text{D}_3$  seit langem Futterrationen beigemischt wird (KÖNIG, 2004), gehen Untersuchungen nun in die Richtung, dieses in Zukunft eventuell durch  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu ersetzen. Über die relative Aktivität der verschiedenen Metaboliten bestehen aber nach wie vor unterschiedliche Meinungen (JAKOBSEN et al., 2007).

Wie den vorherigen Kapiteln entnommen werden kann, ist aus Untersuchungen an Broilern bekannt, dass durch den Einsatz des Metaboliten  $25(\text{OH})\text{D}_3$  eine Dyschondroplasie der Tibia vorgebeugt werden kann. Leistungsverbesserungen in Form von Lebendmassezunahme und Futterverwertung konnten ebenfalls in einigen Untersuchungen ermittelt werden. Für das Schwein liegen bislang nur wenige vergleichbare Studien vor, weshalb hier noch ein großer Untersuchungsbedarf besteht.

JEFFRIES et al. (2002) untersuchten den Einfluss von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  auf Häufigkeit und Schweregrad der Osteochondrose und Arthrosis deformans des Schweines. Dabei konnten sie keine Anzeichen für eine Beeinflussung des Krankheitstypes oder des Schweregrades der Erkrankung durch  $25(\text{OH})\text{D}_3$  erkennen.

Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangen KLUGE et al. (2006). In einer fünfwöchigen Versuchszeit mit Absetzferkeln wurde der Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Vitamin  $\text{D}_3$  und  $25(\text{OH})\text{D}_3$  auf Leistungs-, Blut-, und Knochenparameter untersucht. Die geprüften Parameter wurden durch unterschiedliche Konzentrationen beider Metaboliten nicht beeinflusst.

In einer aktuellen Studie vergleichen JAKOBSEN et al. (2007) den Einfluss von 25(OH)D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> mit folgenden, gemessenen Parametern: der 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalt im Plasma, sowie der Gehalt von Vitamin D<sub>3</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> in der Leber und der Lende. Die Resultate zeigen, dass 25(OH)D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> einen gleichen Einfluss auf das 25(OH)D<sub>3</sub> in Plasma, Fleisch und Leber ausüben. Allerdings führt der alleinige Gebrauch von 25(OH)D<sub>3</sub> zu verringerten Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalten in Fleisch und Leberparenchym. Diese Erkenntnis ist nicht verwunderlich, wenn man sich vor Augen hält, dass die Hydroxylierung von Vitamin D<sub>3</sub> zu 25(OH)D<sub>3</sub> durch die 25-Hydroxylase keine reversible Reaktion ist.

### **25-Hydroxycholecalciferol der Firma DSM**

Im Gegensatz zur Geflügelproduktion, ist 25(OH)D<sub>3</sub> für den Einsatz in der Schweinefütterung noch nicht zugelassen.

Die Versuche von KLUGE et al. (2006) zeigen, dass Vitamin D<sub>3</sub> durch 25(OH)D<sub>3</sub> gleichwertig ersetzt werden kann. Allerdings konnte beim Ferkel, im Gegensatz zum Mastgeflügel, keine Verbesserung von Leistungsparametern und keine Unterschiede im Mineralisierungsprozess der Knochen festgestellt werden.

Seit einigen Jahren treten vermehrt nichtinfektiöse Lahmheiten (Beinschwächesyndrom), sowohl bei wachsenden Tieren, als auch bei Zuchttieren auf. Durch diesen Krankheitskomplex kommt es zu Beeinträchtigungen von Wachstum, Langlebigkeit und Wohlbefinden der Tiere. Die wichtigste Ursache ist die Osteochondrose, welche durch Defekte der Gelenkknorpel und der knorpeligen Wachstumszonen des Knochens charakterisiert ist (GUTZWILLER et al., 2007). Die genaue Ursache des Beinschwächesyndroms ist komplex und nicht vollständig geklärt. Als mögliche Auslöser werden das rasche Wachstum (BUKOVSKY und ESTERMANN, 2007) oder ein Protein- und Phosphormangel angesehen (GUTZWILLER et al., 2007).

Ob durch die Verabreichung des Metaboliten 25(OH)D<sub>3</sub> krankhafte Veränderungen an den Knochen des Schweines vorgebeugt werden kann, lässt sich bisher noch nicht abschließend sagen. Im Gegensatz zur Vorbeugung einer Dyschondroplasie der Tibia bei Broilern, liegen für Ferkel wenig vergleichbare Untersuchungen vor. JEFFRIES et al. (2002) konnten in ihrer Studie zum Einfluss von 25(OH)D<sub>3</sub> auf metabolische Parameter und die genetische Expression der Osteochondrose und Osteoarthritis keine Anzeichen eines möglichen Einflusses von 25(OH)D<sub>3</sub> auf den Schweregrad der Erkrankung feststellen.



### 2.2.4 Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Wie bereits unter 2.2.2 erläutert, wird das hydrophilere 25(OH)D<sub>3</sub> von Menschen besser und schneller absorbiert, als natives Vitamin D. Die in diesem Kapitel geschilderten Ergebnisse stimmen mit klinischen Studien überein, welche bei Patienten mit gestörter Fettabsorption eine bessere Aufnahme von 25(OH)D<sub>3</sub> im Vergleich zu Vitamin D zeigten (???)

Die schnellere und bessere Absorption konnte auch bei anderen Krankheitsbildern, wie chronischen Leberleiden (?) und Patienten mit Knochenerkrankungen (?) nachgewiesen werden.

Bei einem Einsatz von 25(OH)D<sub>3</sub> ist allerdings zu beachten, dass die Halbwertszeit im Vergleich zu Vitamin D<sub>3</sub> kürzer ist und nur eine pharmakologische Wirksamkeit von 3-5 Tagen besteht (BRABANT, 2006).

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Toleranz verschiedener 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosierungen und mögliche Auswirkungen auf Wachstum, Leistung, Gesundheit und laborchemische Parameter beim Absetzferkel.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 24 weibliche und 24 männlich-kastrierte Absetzferkel der Kreuzung Deutsche Landrasse x Large White x Piétrain. Alle Tiere stammten aus demselben Betrieb, wodurch genetische Einflüsse auf das Versuchsergebnis so gering wie möglich gehalten werden konnten. Die Ohrmarkennummer des Betriebes war auf der rechten Seite eingezogen.

Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 6 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von  $9,1 \text{ kg} (\pm 0,93 \text{ kg})$ .

### 3.2 Versuchstierhaltung

Der Stall befand sich auf dem Gelände der Außenstelle Oberwiesenfeld des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die Aufstallung erfolgte gruppenweise in acht je  $7,6 \text{ m}^2$  großen Abteilen mit Teilspaltenboden. Die festen Liegeflächen befanden sich in der Mitte der Buchten und waren mit Gummimatten ausgelegt.

Auf jeder Seite des Raumes waren 4 Buchten, welche durch  $1,05 \text{ m}$  hohe Gitterstäbe voneinander getrennt waren. Es befanden sich Fenster auf beiden Stallseiten. In jeder Bucht war jeweils an der Außenwandseite eine Nippeltränke und an den Seitenwänden 2 Futtertröge mit einer Breite von  $80 \text{ cm}$ , sodass alle Tiere jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser hatten.

Zu Beginn wurde eine Stalltemperatur von  $26^\circ\text{C}$ , kontinuierlich abnehmend bis auf  $22^\circ\text{C}$  am Ende des Versuchs, durch Lüftung und Heizung gewährleistet. Zusätzlich befand sich über jedem Abteil eine Rotlicht-Wärmelampe, welche die ersten 3 Wochen ständig, anschließend nur bei Bedarf brannte.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Grundfuttermittels

<b>Bestandteil</b>	<b>Gehalt in %</b>
Gerste	29,87
Weizen	15,0
Mais	10,0
Hafer	10,0
Kartoffeleiweiß	8,0
Zuckerrüüberbrei	5,45
Sojakuchen	5,0
Melasse	3,5
Sojaöl	2,7
Sojaextraktionsschrot	2,4
Weizenstärke	1,6
Dicalciumphosphat	1,6
Diamol	1,0
Bioadd	0,8
Calciumoxid	0,7
Salz	0,5
Zusatzstoffe	0,5
Vitamine	0,4
Lysin	0,37
Oligoelemente	0,3
Methionin	0,13
Cholin	0,08
Threonin	0,05
Kupfer	0,05

Als Beschäftigungsmaterial wurden Ketten und Bite-Rites (Ferkelbeisssspielzeug zum Aufhängen, bestehend aus einem Plastikkegel mit 4 elastischen Plastik-Beisschwänzen) in den Buchten angebracht.

Nach Anmeldung des Versuchsvorhabens wurde die Studie mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

### 3.3 Tierfutter

Das pelletierte Futter für die Absetzferkel wurde von der Firma DSM Nutritional Products France, Village-Neuf, Frankreich, produziert und bereitgestellt.

Tabelle 3.2: Aufteilung der vier Gruppen: Kontrollgruppe (T1) und drei Versuchsgruppen (T2, T3, T4) mit der empfohlenen Dosis (1x), der Zwischendosis (5x) und der hohen Dosis (10x) von 25(OH)D<sub>3</sub>

Futtermischung	Dosierung pro kg Futter	Wirkstoff
T 1	2000 I.E.	Vitamin D <sub>3</sub>
T 2	0,05 mg	25(OH)D <sub>3</sub>
T 3	0,25 mg	25(OH)D <sub>3</sub>
T 4	0,50 mg	25(OH)D <sub>3</sub>

In das Grundfutter (siehe Tabelle 3.1) wurden unterschiedliche Gehalte an Vitamin D<sub>3</sub> und 25-Hydroxycholecalciferol eingemischt und die Masse anschließend pelletiert.

Eine Ration enthielt die für Aufzuchtferkel empfohlene Dosis an Vitamin D<sub>3</sub>. Die anderen Rationen wurden angereichert mit unterschiedlichen Gehalten an 25-Hydroxycholecalciferol: die empfohlene Dosis (1-fache Dosierung), die Zwischendosis (5-fach überdosiert) und die hohe Dosis (10-fach überdosiert). Die genauen Dosierungen gehen aus Tabelle 3.2 hervor.

In den ersten 9 Tagen wurden die Tiere restriktiv rationiert gefüttert, um futterumstellungsbedingte Durchfallerkrankungen zu verhindern. Die Tiere erhielten dabei je zwei Mahlzeiten pro Tag. Ab dem 10. Tag wurde der Fütterungsmodus auf ad-libitum-Fütterung umgestellt.

Nicht aufgenommenes Futter wurde während des ganzen Versuchszeitraumes einmal pro Woche zurückgewogen. Der Futterverzehr ergab sich aus der Differenz zwischen vorgelegtem Futter und Rückwaage am Tag des Wiegens der Schweine.

Das Wasser stand von Anfang an ad libitum zur Verfügung.

## 3.4 Versuchsaufbau

### Gruppeneinteilung

Am Tag der Einstellung wurden alle Tiere gewogen und dann nach Geschlechtern getrennt. Die weiblichen Tiere erhielten gelbe, fortlaufende Ohrmarken mit Nummern von 1 bis 25; die männlich-kastrierten Tiere erhielten grüne, fortlaufende Ohrmarken mit Nummern von 26 bis 50. Da nur 48 Tiere für den Versuch benötigt wurden, wurde ein weibliches und ein männliches Tier aussortiert.

Danach erfolgte eine weitere Aufteilung in je vier Untergruppen, wobei auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung in Bezug auf das Körpergewicht geachtet wurde.

Letztlich bestand der Versuch also aus acht Gruppen, vier mit weiblichen und vier mit männlich-

kastrierten Tieren, zu je sechs Ferkeln.

Die anschließende Zuordnung der Tiergruppen zu den vier verschiedenen Rationen erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Aus Tabelle 3.2 geht die Einteilung der Versuchsgruppen gemäß der supplementierten Futterzusatzstoffe hervor.

#### **Gesundheitszustand**

Durch einen täglichen Stalldurchgang wurden Gesundheitszustand und Verhalten der Tiere kontrolliert. Dabei wurde unter anderem auf Kotbeschaffenheit, Augen, Haut, Atmung und Bewegung geachtet. Gleichzeitig wurden etwaige technische Mängel und andere störende Einflüsse im Stall offensichtlich und konnten so unmittelbar behoben werden.

Einmal wöchentliche erfolgten Einzeltieruntersuchungen, um den genauen Gesundheitsstatus der Tiere zu erfassen.

#### **Bestimmung der Futteraufnahme**

Die Futteraufnahme (FA) pro Woche wurde für jede Bucht (6 Tiere) gesondert, durch wöchentliche Rückwaage des nicht aufgenommenen Futters, bestimmt.

#### **Lebendmasseentwicklung**

Die Entwicklung der Lebendmasse wurde durch eine am Tag des Ankaufs durchgeführte Wiegung der Tiere und anschließende Wiegungen in wöchentlichem Abstand verfolgt. Die Wiegungen erfolgten mit einer elektronischen Gitterwaage mit Datenausdruck. Die Waage führte automatisch 20 Wiegungen durch und errechnete dann daraus den Mittelwert.

Außerdem wurde am Versuchsende die Lebendmasse für alle Tiere bestimmt, wobei die Tiere jeweils am Tag vor der Euthanasie gewogen wurden.

#### **Futtermittelnutzung**

Mit den für Futteraufnahme und Lebendmasseentwicklung erhaltenen Daten wurde die Futtermittelnutzung (FVW) als benötigte Menge an aufgenommenem Futter in Kilogramm (FA) für ein Kilogramm Lebendmassezunahme (LMZ) errechnet:

$$FVW = \frac{FA \text{ (kg)}}{LMZ \text{ (kg)}}$$

#### Versuchsende

Die Fütterungs-/Versuchsdauer betrug insgesamt 6 bzw. 7 Wochen. Die unterschiedliche Dauer lag in der sofortigen, pathologischen Untersuchung der Tiere nach der Euthanasie begründet. Da dies aus organisatorischen und technischen Gründen nicht am gleichen Tag oder an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden konnte, blieben je die drei leichtesten Tiere pro Bucht eine Woche länger im Stall.

Einen Tag vor der ersten Euthanasie, also an Tag 41, wurden noch einmal alle Tiere gewogen und Blut genommen.

Die Blutentnahme erfolgte aus der rechten Vena jugularis nach Fixierung des Tieres mit einer Oberkieferschlinge. Die Einstichstelle befindet sich am Rande des M. brachiocephalicus auf der Linie zwischen dem Vorderrand des Buggelenks und der Spitze des Brustbeins. Dazu wurden sterile Einmalkanülen, *Sterican*® der Firma Braun mit einer Größe von 1,2 x 100 mm verwendet.

Von jedem Tier wurden jeweils zwei *S-Monovetten*® mit Gerinnungsaktivator (9 ml, Firma Sarstedt) und ein EDTA-Röhrchen (5 ml EDTA-Röhre mit Druckstopfen (Sarstedt)) entnommen.

Die Verarbeitung der EDTA-Blutproben erfolgte innerhalb der nächsten drei Stunden an der Klinik für Schweine der LMU München.

Die Serumblutproben wurden noch vor Ort weiterverarbeitet, wofür sie zuerst 15-30 Minuten stehen gelassen wurden, um anschließend bei 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert zu werden (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Das überstehende Serum wurde danach in je drei 2,5 ml-Eppendorf-Cups abpipettiert und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Am Tag der Euthanasie erfolgte die Entnahme von Kotsammelproben aus jeder Bucht, wobei pro Bucht mindestens 6 verschiedene Stellen beprobt wurden.

Zudem wurde, so fern dies möglich war, von jedem Tier eine Urinprobe mittels Cystozentese unter Ultraschallkontrolle genommen. Durch den oft stressbedingten Urinabsatz der Tiere während der Euthanasie, war das jedoch nicht von jedem Tier möglich. Von manchen Tieren konnte nur eine Probe direkt während des Urinabsatzes genommen werden.

Die Euthanasie erfolgte, während das Tier mit einer Oberkieferschlinge fixiert wurde, durch Pentobarbital Natrium (400 mg/1 ml *Eutha*® 77) 0,1-0,2 ml/kg KG.

Am Institut für Tierpathologie, Tierklinisches Department der LMU München, wurden die Tiere daraufhin an 5 Sektionstischen im Team makroskopisch-anatomisch untersucht, wobei besonders auf eventuelle Verkalkungen und den Gesundheitsstatus des Tieres geachtet wurde.

Danach folgte die Entnahme der Organe, wobei von Herz, Lunge, Leber, Milz und der linken und rechten Niere das Gewicht mittels einer Präzisionswaage (Sartorius CP2202S, max. 2200 g, d=0,01 g) ermittelt wurde.

Zur Untersuchung auf 25-Hydroxycholecalciferol und weitere Parameter wurden Gewebeproben von Leber (Lobus hepatis sinister lateralis), Niere (links), Muskel (M. quadriceps femoris, links), Haut (Thoraxwand, links) und Fett (Inguinalgegend, links) in Plastiktüten gegeben und danach bei -20°C eingefroren. Der linke Femur, ebenfalls von jedem Tier entnommen, wurde später mittels feiner Präparierschere und Einmalskalpell vollständig von Muskeln, Sehnen und Bändern befreit, in mit Ringer-Lösung (Serumwerk Bernburg AG) getränkte Kompressen gewickelt, um eine Austrocknung zu verhindern, und ebenso bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

Weitere Gewebeproben für die patho-histologische Untersuchung von Leber (Lobus hepatis dexter lateralis), Niere (rechts), Lunge (Lobus cranialis dexter), Herz (Septum), Aorta (A. thoracica) und Muskel (M. quadriceps femoris, rechts) wurden ebenfalls in Plastiktüten gegeben und blieben zur weiteren Untersuchung am Institut für Tierpathologie der LMU München.

Für eventuelle Nachuntersuchungen wurden Gewebeproben von Milz, Thymus, Lymphknoten (Darmlymphknoten), Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Pankreas und Knochen (rechts, proximale Metaphyse mit Spongiosa und Kompakta) entnommen, in Formaldehyd fixiert und ebenfalls für eine eventuelle patho-histologische Untersuchung am Institut für Tierpathologie, Tierklinisches Department der LMU München belassen.

## 3.5 Patho-histologischer Untersuchungsgang

Der patho-histologische Untersuchungsgang (ROMEIS und BÖCK, 2009; BURCK, 1988) wurde von den Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie, Tierklinisches Department der LMU München, durchgeführt. Die oben genannten Proben wurden zuerst in 7%-ig gepuffertem Formalin fixiert. Daraufhin folgten verschiedene Einbettungs- und Färbemethoden, wobei von den in Paraffin eingebetteten Proben eine Hämalaun-Eosin- und eine von-Kossa-Färbung angefertigt wurde und von den in Kunststoff eingebetteten Proben eine Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung.

### 3.5.1 Einbettungsmethoden

#### Paraffineinbettung

Zuerst wurden größere Gewebestücke zugeschnitten und in Leitungswasser gespült. Danach folgte eine Entwässerung des Gewebes (Autotechnicon Duo 2a, Technicon Ltd.) und anschließend die Einbettung (Tissue Tek II Tissue embedding Center 4604) in Paraffin (*Paraplast®*, Schmelzpunkt 56° C, Monoject Scientific Inc.).

#### Kunststoffeinbettung

Dieses Verfahren wurde in Anlehnung an die von HERMANNNS et al. (1981) beschriebene Methode durchgeführt.

Die Gewebeproben wurden nicht nach dem sonst üblichen Verfahren in Cacodylat-gepufferter Formaldehydlösung bei 4° C fixiert, sondern direkt aus der Fixierung in 5%-igem, ungepufferter Formalin bei Zimmertemperatur in einen Gewebeeinbettungsautomaten (Ditadell 1000, Shandon) gegeben. Darin wurden die Proben bei Zimmertemperatur zuerst für vier Stunden in Cacodylatpuffer gespült und danach entwässert.

#### *Spülflüssigkeit*

**70 g** Saccharose (Merck)

**735 mg** Calcium-Dihydrat (Merck)

**1000 ml** Cacodylatpuffer

pH-Wert auf 7,2 einstellen

#### *Entwässern:*

**2 Std.** 30% Ethanol

**1 Std.** 50% Ethanol

**2 Std.** 70% Ethanol

**4 Std.** 96% Ethanol

**5 Std.** 96% Ethanol



### **3 Std. 96% Ethanol**

Darauf folgte eine 5-stündige Durchtränkung der Proben in einem Kunststoffgemisch aus Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (GMA, Merck) und Methacrylsäure-methylester (MMA, Merck) im Verhältnis 1:1 bei 4°C auf einem Taumelgerät (Heidolph) und schließlich wurden die Gewebestücke für 19 Stunden ebenfalls bei 4°C mit dem Einbettungsmedium durchtränkt.

*Einbettungsmedium:*

**60 ml** GMA (Methacrylsäure-2-hydroxyethylester, Merck)

**20 ml** MMA (Methacrylsäure-methylester, Merck)

**16 ml** Butylglykol (Ethylenglykolmonobutylether, Merck)

**2 ml** Polyethylenglykol 400 (Merck)

**338 mg** Benzoylperoxid (mit 25% H<sub>2</sub>O, Merck)

Zu jeweils 40 ml des Einbettungsmediums wurden unmittelbar vor dem Ausgießen 60 µl N,N-Dimethylanilin (Merck) als Starter zugegeben. Im nächsten Schritt wurde ein Polyethylengefäß (8,0 ml von Bender & Hobein) mit Einbettungsmedium gefüllt, anschließend das Gewebe auf den Boden des Gefäßes gelegt und dieses luftdicht verschlossen. Die Polymerisation des Kunststoffes fand bei 4°C statt. Um die dabei entstehende Polymerisationswärme abzuführen, wurden die Gefäße ins Wasserbad gestellt. Nach 24 Stunden konnten die erhärteten Blöcke aus den Gefäßen entfernt, und durch Anfeilen bis zum Gewebe, zum Schneiden vorbereitet werden.

### **3.5.2 Anfertigung histologischer Schnitte**

Die Objektträger (ohne Mattrand, GLW), die zur Anwendung für Färbungen vorgesehen waren, wurden durch Tauchen in 96%-igem Ethanol entfettet.

#### **Paraffinschnitte**

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Microm) wurden 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt, im 37°C heißen Wasserbad (GFL) gestreckt und auf die vorbehandelten Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Präparate bei 42-45°C in einem Brutschrank über Nacht getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die einzelnen Färbungen wurden die Schnitte 10 Minuten bei 80°C im Brutschrank und anschließend je 10 Minuten in zwei verschiedenen Xylolbädern (Graen) entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurden sie daraufhin in eine absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50%) verbracht und danach kurz in Aqua dest. gespült.

#### **Kunststoffschnitte**

Die Herstellung der Kunststoffschnitte erfolgte an einem Hartschnittmikrotom (Reichert-Jung Supercut 2050, Cambridge Instruments GmbH). Die ca. 2 µm dicken Kunststoffschnitte wurden in 37°C warmen Wasser gestreckt, auf entfettete Objektträger aufgezogen und anschließend auf einer Heizplatte (Gerhardt) bei 50°C getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur.

Der Kunststoff musste im Gegensatz zu den Paraffinschnitten vor den Färbungen nicht aus den Schnitten herausgelöst werden, wodurch eine weitere Vorbehandlung der Schnitte nicht erforderlich war.

### **3.5.3 Färbemethoden**

#### **Hämalaun-Eosin-Färbung**

Bei der Hämalaun-Eosin-Färbung handelt es sich um eine einfache, rasch auszuführende Übersichtsfärbung, welche zur Routine des histologischen Labors gehört. Die Färbung zeigt Zellkerne, Kalk und grampositive Bakterien blau, alles übrige in verschiedenen Tonabstufungen rot.

#### **Hämalaun-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten**

##### *Färbeverfahren*

Schnitte entparaffinieren und in Aqua dest. bringen.

**5 min** in Mayers Hämalaun (Merck) färben

**5 min** in fließendem Leitungswasser bläuen

**ca. 2 sec** differenzieren in 0,5% HCl-Ethanol

**5 min** wässern in fließendem Leitungswasser

**1-5 min** Eosin-Lösung (1%) (Merck)

Anschließend wurden die Schnitte in der aufsteigenden Ethanolreihe aus vergälltem Ethanol (50%, 70%, 80%, 96%, 100%) dehydriert und in Karbolxylol und Xylol gebracht. Die Schnitte wurden mit einem xylolhaltigen Einbettungsmedium (*Vitro-Clud*®) eingedeckt.

### **Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung an Kunststoffschnitten**

#### *Färbeverfahren*

**20 min** in Mayers Hämalaun (Merck) färben

**10 min** in fließendem Leitungswasser bläuen

**ca. 2 sec** differenzieren in 1% HCl-Ethanol

**10 min** unter fließendem Leitungswasser wässern

**1-5 min** Präparate kurz zwischen Fließpapier legen und dann auf der Heizplatte bei 40°C trocknen.

**2 min** in der Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung färben

**10 min** in Leitungswasser spülen

Anschließend wurden die Schnitte zwischen Fließpapier und danach auf der Heizplatte (Gerhardt) bei 40°C getrocknet, in Xylol (Graen) gestellt und mit einem xylolhaltigen Einbettungsmedium (*Eukitt*®, Kindler) eingedeckt.

### **Silbermethode nach von Kossa**

Diese Methode ist kein spezifischer Calciumnachweis, eher eine histologische Färbetechnik zur Untersuchung des Knochengewebes. Calcium in den Carbonaten und Phosphaten wird gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Kalkhaltige Areale im Schnitt sind braunschwarz markiert, Kerne entsprechend der Gegenfärbung. Dieses Verfahren kann nicht bei Kunststoffschnitten durchgeführt werden.

#### *Färbeverfahren*

Schnitte entparaffinieren und in Aqua dest. bringen.

**10-20 min** in hellem Sonnenlicht: in 5%ige, wässrige Silbernitratlösung einstellen

**1-5 min** spülen in Aqua dest.

**2 min** fixieren in 5%iger Natriumthiosulfatlösung

**1-5 min** spülen in Aqua dest.

**3 min** Gegenfärbung der Kerne mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat

Abspülen und entwässern.

### **3.6 Bestimmung zellulärer Bestandteile des Blutes**

Die hämatologische Laboruntersuchung wurde noch am Tag der Entnahme durchgeführt. Die Zahl der **Erythrozyten**, **Leukozyten** und **Thrombozyten**, der **Hämoglobingehalt**, der **Hämatokrit** und der **MCHC** wurden mit einem vollautomatischen Blutkörperchenzählgerät (*Celltek*®, Bayer Diagnostics, Fernwalde) elektronisch bestimmt. Das Gerät wurde bei Inbetriebnahme kalibriert (*Para 12*®, Fa. Vaupel GmbH, Hanau).

**MCH** (Mean Corpuscular Hb = mittlere Hb-Masse/Ery) und **MCV** (Mean Corpuscular Volume = mittleres Volumen eines Ery) sind errechnete Werte aus den oben ermittelten Parametern.

Zur Erstellung des Differentialblutbildes wurde das EDTA-Blut spätestens drei Stunden nach Probenentnahme auf einen Objektträger ausgestrichen und nach Lufttrocknung mit einem automatischen Färbegerät *Hema-Tek*® 2000 (Fa. Bayer, Deutschland) nach Pappenheim gefärbt. Die Differenzierung des weißen Blutbildes erfolgte dann mikroskopisch, wobei je 100 Zellen beurteilt wurden. Die Aufteilung der Leukozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien in Lymphozyten, Monozyten, sowie stabkernige und segmentkernige neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten.

Das *Celltek*® zählt die korpuskulären Bestandteile des Blutes durch Messung der Impedanzänderung. Das Vollblut wird zunächst durch Zugabe einer isotonen Lösung im Inneren des Gerätes nach dem Ansaugen der Probe verdünnt. Die Elektrolytlösung mit den Blutzellen wird mit-

tels Unterdruck durch eine mikroskopisch kleine Öffnung in das Innere einer Zählkammer gesaugt. Zwei Messelektronen sind innen und außen an der Zählkammer angebracht, zwischen beiden fließt ein Konstantstrom. Jedesmal, wenn eine Blutzelle die Messöffnung passiert, steigt der elektrische Widerstand kurzzeitig an, und zwar proportional zum Volumen der Zelle, da der elektrische Widerstand der Zellmembran deutlich größer ist, als der Widerstand der Elektrolytlösung. Durch richtige Einstellung der Impulshöhe (Schwellwert) können die Impulse von roten Blutzellen und Blutplättchen getrennt erfasst und gezählt werden. Für die Zählung der weißen Blutzellen werden die roten Blutzellen zuvor durch Zugabe eines Hämolysemittels hämolysiert.

Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern der Klinik für Schweine, Tierklinische Department der LMU München, durchgeführt.

## 3.7 Bestimmung klinisch-chemischer Parameter im Serum

Die Gewinnung des Serums gelang durch Zentrifugation (10 min bei 3000 U/min) nach Spontanerinnung des Blutes. Da nicht alle Proben sofort untersucht werden konnten, wurde das Serum in je drei 2,5 ml-Eppendorf-Cups abpipettiert und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur erfolgte die Messung der Enzyme **AST**, **GLDH**, **AP** und **GGT**, sowie der Substrate **Glucose**, **Harnstoff**, **Gesamtbilirubin**, **Gesamteiweiß** und **Albumin**, **Kreatinin**, ebenso wie der Spurenelemente **Gesamtcalcium** und **anorganisches Phosphat** vollautomatisch am Autoanalyzer *Hitachi 911*® (Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland), unter Benutzung der dazugehörigen Systempackungen (Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland). Der Automatic Analyzer *Hitachi 911*® wurde täglich bei Inbetriebnahme kalibriert (Calibrator for automated System, Assayed Multisera Normal, Fa. Randox, Crumlin, United Kingdom). Außerdem erfolgte nach jeder zehnten gemessenen Probe eine Kontrollmessung der einzelnen Parameter mit den dafür bestimmten Reagenzien (*Precinorm*® U und *Precipath*® U Fa. Roche, Mannheim).

Die Elektrolytkonzentrationen von **Natrium**, **Kalium** und **Chlorid** wurden mit Hilfe des Elektrolytmessgeräts *664 Fast 4 System*® (Fa. Bayer, Fernwald) ermittelt. Die **BAP** (Knochenspezifische Alkalische Phosphatase) wurde mit Hilfe eines auf Mikrotiterstreifen beruhenden Immunoassays gemessen.

Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern der Klinik für Wiederkäuer, Tierklinisches Department der LMU München, durchgeführt.

Der Nachweis von **25-Hydroxycholecalciferol** erfolgte durch die Laboratorien der DSM Nutri-

tional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel).

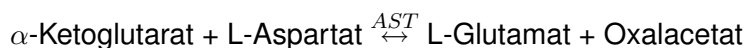
### 3.7.1 Aspartat-Amino-Transferase (AST), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Glucose, Harnstoff

Die gesuchten Parameter wurden am Autoanalyzer *Hitachi 911*® (Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland) durch den UV-Test ermittelt. Das Prinzip des UV-Tests beruht auf Messung der katalytischen Aktivität von Enzymen. Hierfür liegen Nikotinamidadenindinukleotide (NAD/NADP) als Messgrößen zugrunde. Die reduzierten Formen absorbieren im UV-Bereich, die oxidierten hingegen nicht. Ändert sich während einer Reaktion der Redoxstatus der Adenindinukleotide, so ändert sich konzentrationsabhängig auch die Lichtabsorption und damit bei spektralphotometrischen Messungen die Extinktion.

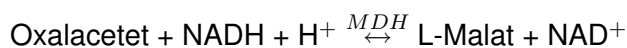
Man unterscheidet einfache kinetische Tests (das Adenindinukleotid ist direkt in die Reaktion des zu bestimmenden Enzyms integriert) und zusammengesetzte kinetische Tests (2- oder 3-Stufenreaktionen, bei denen der Reaktion, die das zu bestimmende Enzym katalysiert, eine oder zwei Reaktionen angeschlossen werden und ein Produkt der ersten oder zweiten Reaktion unter Beteiligung eines Adenindinukleotids quantitativ umgesetzt wird).

#### Aspartat-Amino-Transferase (AST)

Die AST katalysiert die Umwandlung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und L-Aspartat zu L-Glutamat und Oxalacetat.



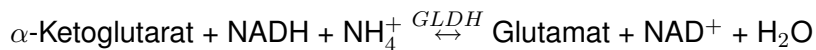
Die Aktivität des Enzyms wird bestimmt durch die Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen Oxalacetat-Zunahme. Diese wird in der gekoppelten, durch Malat-Dehydrogenase (MDH) katalysierten Indikatorreaktion bestimmt.



Dabei wird NADH zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Oxalacetat und somit der AST-Aktivität und wird photometrisch gemessen.

#### Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

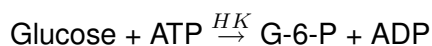
$\alpha$ -Ketoglutarat wird durch GLDH unter  $\text{NAD}^+$ -Bildung zu Glutamat umgesetzt.



Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional zur GLDH-Aktivität und wird photometrisch (Wellenlänge: 344-700 nm) gemessen.

### Glucose

Glucose wird durch ATP und Hexokinase (HK) zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert.



Glucose-6-Phosphat wird in Gegenwart von NADP durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) zu Gluconat-6-Phosphat oxydiert. Andere Kohlenhydrate werden nicht oxydiert.



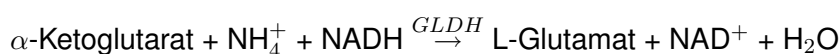
Die Geschwindigkeit der NADPH-Zunahme ist direkt proportional zur Glucosekonzentration und wird photometrisch (Wellenlänge: 340-405 nm) gemessen.

### Harnstoff

Harnstoff wird durch Urease zu Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) und Ammoniak (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) hydrolysiert.



Der gebildete Ammoniak reagiert anschließend mit  $\alpha$ -Ketoglutarat und NADH in Gegenwart von GLDH zu Glutamat und NAD<sup>+</sup>.



Die Extinktionsabnahme durch den Verbrauch von NADH wird anschließend photometrisch (Wellenlänge: 340-700 nm) gemessen.

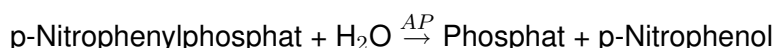
### 3.7.2 Alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß, Albumin, Gesamtcalcium, Phosphat, Kreatinin

Die gesuchten Parameter wurden am Autoanalyzer *Hitachi 911*® (Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland) durch den nicht enzymatischen Farb-Test ermittelt. Durch Zugabe von speziellen Reagenzien zur Probe, kommt es zur Bildung von Farbkomplexen. Die Farbintensität dieser

Komplexe ist direkt proportional zu der zu bestimmenden Parameterkonzentration und wird photometrisch gemessen.

#### **Alkalische Phosphatase (AP)**

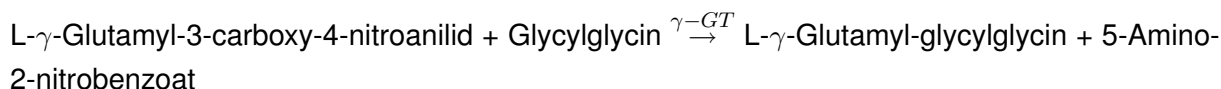
p-Nitrophenylphosphat wird in Gegenwart von Magnesiumionen durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten.



Das dabei freigesetzte p-Nitrophenol ist proportional zur AP-Aktivität und wird photometrisch (Wellenlänge: 450-546 nm) gemessen.

#### **Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT)**

Die Gamma-Glutamyltransferase überträgt den  $\gamma$ -Glutamylrest von L- $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid auf Glycylglycin.



Der dabei freigesetzte Farbstoff 5-Amino-2-nitrobenzoat ist proportional zur GGT-Aktivität und wird photometrisch (Wellenlänge: 415-660 nm) gemessen.

#### **Gesamtbilirubin**

Indirektes Bilirubin wird durch ein Detergenz freigesetzt. Dann wird das Gesamtbilirubin in stark saurer Lösung mit 2,5-Dichlorphenyldiazoniumsalz an das entsprechenden Azobilirubin gekoppelt.

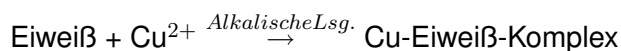


Die Farbintensität des gebildeten roten Azofarbstoffs ist direkt proportional zur Gesamtbilirubinkonzentration und wird photometrisch (Wellenlänge: 660-570 nm) gemessen.

#### **Gesamteiweiß**

Zweiwertiges Kupfer reagiert in alkalischer Lösung mit der Peptidbindung der Eiweiße zum charakteristischen purpurfarbenen Biuretkomplex. Mit Natrium-Kalium-Tartrat wird die Ausfällung von Kupferhydroxid und mit Kaliumjodid die Autoreduktion des Kupfers verhindert.





Die Farbintensität des Biuretkomplexes ist direkt proportional zur Eiweißkonzentration und wird photometrisch (Wellenlänge: 546-700 nm) gemessen.

#### Albumin

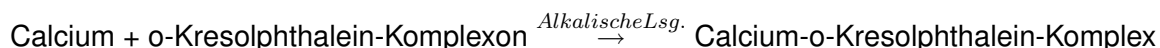
Albumin weist bei einem pH-Wert von 4,1 einen ausreichend kationischen Charakter auf, um eine Bindung mit dem Anionenfarbstoff Bromcresolgrün (BCG) unter Bildung eines blaugrünen Komplexes einzugehen.



Die Farbintensität der blaugrünen Farbe ist direkt proportional zur Albuminkonzentration und wird photometrisch gemessen.

#### Gesamtcalcium

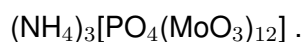
Calcium bildet in alkalischer Lösung mit o-Kresolphthalein einen violetten Farbkomplex.



Die Farbintensität des gebildeten violetten Komplexes ist direkt proportional zur Calciumkonzentration und wird photometrisch gemessen.

#### Anorganisches Phosphat

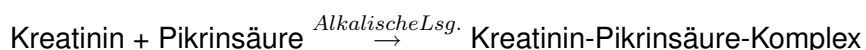
Anorganisches Phosphat bildet mit Ammoniummolybdat in schwefelsaurer Lösung einen Ammoniumphosphomolybdat-Komplex nach der Formel:



Dieser Komplex wird im ultravioletten Bereich (340 nm) photometrisch gemessen.

#### Kreatinin

Jaffé-Methode: Nach Zugabe von Pikrinsäure startet die Reaktion:



Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelb-orange gefärbten Komplex, dessen Farbintensität, direkt proportional zur Kreatininkonzentration, photometrisch gemessen wird.

Bestimmungen unter Anwendung des Rate-Blanking minimieren Störungen durch Bilirubin. Serum- und Plasmaproben enthalten Proteine, die unspezifisch mit der Jaffé-Methode reagieren. Um richtige Werte zu erhalten, müssen die Ergebnisse für Serum und Plasma um 0,3 mg/dl bzw. 26  $\mu\text{mol/l}$  korrigiert werden. Diese Korrekturangaben können unter den Geräteeinstellungen berücksichtigt werden.

#### 3.7.3 Natrium, Chlorid, Kalium

Beim *664 Fast 4 System*® (Elektrolyt-Analysator) handelt es sich um ein Analysengerät, das mittels ionenselektiver Elektroden (Potentiometrische Messmethode) die Elektrolyte Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ) und Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) bestimmt. Die zu untersuchende Probe wird durch das Gerät aufgesaugt und an drei Messelektroden, sowie an einer Referenzelektrode vorbeigeführt. Die Analyse der drei Parameter erfolgt gleichzeitig.

#### 3.7.4 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP)

Der *Metra*® BAP Immunassay ermöglicht die quantitative Bestimmung der BAP im Serum, ein Indikator der Osteoblastenaktivität. Dabei handelt es sich um einen auf Mikrotiterstreifen beruhenden Immunassay, bei dem die in der Probe vorliegende BAP an die mit einem monoklonalen Anti-BAP-Antikörper beschichteten Mikrotiterstreifen gebunden wird. Die Enzymaktivität des gebundenen BAP wird mit Hilfe eines pNPP (Para-Nitrophenylphosphat)-Substrates bestimmt. Die BAP spaltet das pNPP in das gelbe Endprodukt p-Nitrophenol. Die Absorbanz wird dann bei 405 nm abgelesen. Anhand einer Standardkurve kann nun der dazugehörige BAP-Wert ermittelt werden.

Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik, Veterinärwissenschaftliches Department der LMU München, durchgeführt.

#### 3.7.5 25-Hydroxycholecalciferol

Diese Untersuchung wurde nicht in den Laboratorien der LMU München, sondern in den Laboratorien von DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) durchgeführt.

Die Bestimmung von 25-Hydroxycholecalciferol ( $25(\text{OH})\text{D}_3$ ) in Plasma, Futter (PATENT,

2005) und Gewebe basiert auf der Untersuchung einer Isotopenverdünnung mit Hilfe eines Agilent 1100 Umkehrphasen-HPLC-MS-Systems (Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung). Eine Trennsäule dient der quantitativen Bestimmung. Die Durchführung für die verschiedenen Matrices sind ähnlich und unterscheiden sich vor allem in der Probenaufbereitung. Das Verfahren für die Untersuchung des Plasmas, sowie die wichtigsten Unterschiede zu den anderen Materialien, werden unten ausführlich beschrieben.

Kurz dargestellt wird 25, 25, 25, 26, 26, 26-hexadeutero-25(OH)D<sub>3</sub> vorher zur Extraktion zu den Proben hinzugefügt und als interner Standard genutzt.

Futterproben werden in Wasser dispergiert und mit Tert-Butyl-Methyl-Ether (TMBE) extrahiert. Ein Aliquot der TMBE-Phase wird zur Reinigung des Extrakts in eine semi-präparative HPLC gegeben (PATENT, 2005). Die 25(OH)D<sub>3</sub>-enthaltende Fraktion wird gesammelt und anschließend im HPLC-MS-System untersucht.

Die Plasmaproben werden nach einer Proteinausfällung mit Acetonitril (150/250, v/v) und anschließender Zentrifugation, direkt analysiert.

Die Gewebeproben werden in kleine Stücke geschnitten, homogenisiert und danach mit Methanol in einer Kugelmühle extrahiert. Das daraus resultierende Homogenisat wird zentrifugiert und der Überstand für die HPLC-MS-Analyse verwendet.

Das HPLC-MS-System beinhaltet zwei Trennsäulen und Gradientenelution. Als erste, d.h. analytische Trennsäule dient eine Aquasil C18, 3x100 mm, 3 µm, verbunden mit Pumpe 1, während Pumpe 2 mit dem Einspritzventil und einer zweiten Trennsäule zum Auffangen, eine Aquasil C18, 3x10 mm, verbunden ist. Nach 1,65 Minuten schaltet die Auffangtrennsäule für 0,55 Minuten zu Pumpe 2, schritthaltend mit der analytischen Trennsäule für den Transfer des aufgefangenen 25(OH)D<sub>3</sub>. Das Injektionsvolumen beträgt 90 µl für die Futter- und Plasma-, sowie 75 µl für die Gewebeuntersuchung. Die Retentionszeit von 25(OH)D<sub>3</sub> beträgt ungefähr 4 Minuten. Eluent A besteht aus Wasser mit 0,05% Ameisensäure, Eluent B1 besteht aus Methanol mit 0,05% Ameisensäure, und Eluent B2 besteht aus einem Wasser/Methanol-Gemisch (4/96, v/v) mit 0,05% Ameisensäure.

Pumpenprogramm für Pumpe 1 mit einer Durchflussrate von 0,6 ml/min:

- 0 - 4,4 min : 0% B1, 100% Eluent A
- 4,4 - 4,5 min : lineare Zunahme auf 100% B1
- 4,5 - 6,5 min : 100% B1, 0% Eluent A

- 6,5 - 6,6 *min* : lineare Abnahme auf 0% B1
- 6,6 - 7,5 *min* : 0% B1, 100% Eluent A

Pumpenprogramm für Pumpe 2 mit einer Durchflussrate von 0,5 *ml/min*:

- 0 - 0,5 *min* : lineare Zunahme von 60% B2 auf 90% B2, Rest Eluent A
- 0,5 - 2,0 *min* : 90% B2, 10% Eluent A
- 2,0 - 2,1 *min* : lineare Zunahme auf 100% B2
- 2,1 - 5,0 *min* : 100% B2, 0% Eluent A
- 5,0 - 5,1 *min* : lineare Abnahme auf 60% B2, Rest Eluent A
- 5,1 - 7,5 *min* : 60% B2, 40% Eluent A

Zur Quantifizierung dient ein Agilent 1100 Single Massenspektrometer mit einer APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)-Quelle in einem sicheren Verfahren mit einheitlicher Lösung. 25(OH)D<sub>3</sub> und der interne Standard werden im SIM-Modus mit Hilfe von quasi-molekularen Ionen nachgewiesen: die 25(OH)D<sub>3</sub>-Masse beträgt 401,3 *u*, und die Masse von 25(OH)D<sub>3</sub>-d<sub>6</sub> beträgt 407,3 *u*. Die folgende Ionenquelle und andere MS-Instrumentenparameter werden eingesetzt:

**Trockengas** 9,5 *l/min* bei 225° C

**Gassprühnebel** 50 *psig* bei 250° C

**Spannung** 3000 *V*

**Stromstärke** 10 *μA*

**Fragmentor** 90 *V*.

Zur Untersuchung der Plasmaproben wird das HPLC-System mit aufbereiteten Rinder-Serumalbumin-Proben (5% aq.) kalibriert. Zur Qualitätskontrolle werden kommerziell erhältliche Kontrollsera (Chromsystems, München, Deutschland) verwendet. Die Kalibrierung und der Qualitätsnachweis bei der Untersuchung von Futter- und Gewebeproben wird mit Referenzlösungen durchgeführt.

Folgende untere Nachweisgrenzen wurden ermittelt:

**Futter** 5  $\mu\text{g/kg}$

**Plasma** 5  $\text{ng/ml}$

**Muskel** 5  $\text{ng/g}$

**Leber und Niere** 10  $\text{ng/g}$

**Haut und Fett** 20  $\text{ng/g}$ .

### 3.8 Bestimmung der Knochenparameter

Die Knochen wurden mittels feiner Präparierschere und Einmalskalpell vollständig von Muskeln, Sehnen und Bändern befreit, in mit Ringer-Lösung (Serumwerk Bernburg AG) getränkte Kompressen gewickelt, was eine Austrocknung verhinderte, und bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 3.8.1 Knochenlänge, -durchmesser und -masse

Von allen Tieren wurden die Masse und die Länge des linken Femurs bestimmt.

Zur genauen Längenmessung erfolgte mit Hilfe einer elektronische Schublehre (Elektr. Digital Messschieber 150 x 0,01  $\text{mm}$  Art. Nr. C229 849, Vogel, Kevelaer).

Die Bestimmung des Durchmessers erfolgte laterolateral mittig am Schaft zwischen Trochanter minor und den beiden Condylen. Die Länge war definiert vom proximalen Caput femoris diagonal zum distalen Ende des Condylus lateralis ossis femori. Zur Messung des Durchmessers und der Länge zeigte die Caudalfläche des Knochens zur messenden Person.

#### 3.8.2 Bruchlast und Dehnung der Knochen

Diese Untersuchung fand an einer Material-Prüfmaschine (DO-FB005TS) der Firma Zwick/Roell (Ulm) statt und wurde anhand der dazugehörenden Software (TXPERT Maschine

V.11.0) ausgewertet. Bestimmt wurden die Bruchlast  $F_{max}$  in  $N$  (Newton) und die maximale Dehnung  $\epsilon$ - $F_{max}$  vor der Brechung in  $mm$ . Dabei lag der Femur auf der cranialen Fläche, wobei das Caput ossis femoris und die Trochlea ossis femoris die Auflagefläche berührten.

Nachfolgend die für die Messung festgelegten Einstellungen:

**Einspannlänge** 40  $mm$

**LE-Geschwindigkeit** 500  $mm/min$

**Vorkraft** 5  $N$

**Vorkraft-Geschwindigkeit** 150  $mm/min$

**Prüfgeschwindigkeit** 150  $mm/min$

**Kraftabschaltstelle** 80 %  $F_{max}$

**Kraftschwelle für Bruch-Untersuchung** 10  $N$

**Obere Kraftgrenze** 5000  $N$

**Max. Längenänderung/Dehnung** 12  $mm$

Der Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene des Veterinärwissenschaftlichen Departments der LMU München, stellte freundlicherweise die nötigen Räumlichkeiten und das Prüfgerät zur Verfügung.

#### 3.8.3 Trockensubstanz der Knochen

Nachdem das Gewicht der rohen Knochen in ihrer ursprünglichen Substanz (US) bestimmt war, wurden die Knochen mit einem Vorschlaghammer zerkleinert, und dabei vor allem darauf geachtet, dass ein größerer Teil der Markhöhle eröffnet wurde. So passten sie in Porzellantiegel (Haldenwanger 79MF1A) und wurden im Trockenschrank (Heraeus Funktion Kine, Firma KENDRO, Langenselbold) bei  $103^{\circ}C$  für ca. 14 Tage bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Trockensubstanz ergab sich aus dem Gewicht der Tiegel samt getrockneter Knochen, abzüglich des Tiegelleergewichtes.

### 3.8.4 Veraschung der Knochen

Für die Mineralstoffbestimmung aus den Knochen wurden die getrockneten Knochen zunächst im Muffelofen (*Thermicon*® II4021, HERAEUS, Hanau) verascht. Da die Knochen schon zur Bestimmung der Trockensubstanz in Porzellantiegel eingewogen worden waren, konnten sie direkt in den Muffelofen verbracht werden. Der Veraschungsprozess fand bei 600°C statt, wobei der Ofen in Etappen aufgeheizt wurde, um ein Überkochen und Verbrennen der Probe zu verhindern. In den ersten 24 Stunden wurde er deshalb kontinuierlich auf 200°C, und in den folgenden 24 Stunden langsam und gleichmäßig auf 600°C aufgeheizt. Nach Erreichen der Endtemperatur (600°C) verblieben die Proben dort mindestens 7 Tage, bis sie rein weiß geworden waren. Anschließend wurde die Knochenasche in etwa 160 ml Salzsäure (*Rotipuran*® 37%, ROTH, Karlsruhe, Art. Nr. 4625.2) aufgenommen und mit bidestilliertem Reinstwasser (Reinstwasseranlage der Serie ULTRA CLEAR; SG WASSERAUFBEREITUNG UND REGENERIERSTATION GmbH, Barsbüttel), mit welchem die Tiegel auch noch einmal nachgespült wurden, auf 250 ml verdünnt.

### 3.8.5 Calcium- und Phosphorbestimmung der Knochen

#### Calciumbestimmung

Die Bestimmung des Calciumgehaltes der Knochen erfolgte mit einem Flammenphotometer (EFOX 5053, EPPENDORF, Hamburg). Hierzu wurde die Aschelösung auf ein Verhältnis von 1:100 mit Reinstwasser verdünnt, in 1,5 ml Eppendorfcups aliquotiert und anschließend gemessen.

Die angesaugte Lösung wird im Flammenphotometer durch den Zerstäuber mittels Druckluft fein verteilt. Diese Luft-Lösung (Aerosol) wird mit dem Brenngas (Acetylen) gemischt und in die Flamme injiziert. Dabei entsteht ein Aufleuchten der Flamme, das durch die Anregung einzelner Atome zustande kommt. Je mehr Atome vorhanden sind, umso stärker ist die ausgestrahlte Lichtmenge. So kann aus der Messung der Lichtintensität der Standards und der Lösungen auf die Konzentration des zu messenden Elementes geschlossen werden. Jedes Element erzeugt in der Flamme eine charakteristische Farbe mit einer bestimmten Wellenlänge. Durch das Dazwischenhalten eines Filters lässt sich für jedes Element eine bestimmte Wellenlänge selektieren. Das durch den Filter gehende Licht wird photoelektrisch gemessen.

Der Ca-Gehalt der Knochen ergibt sich aus folgender Formel, wobei der Wert 40,08 g/mmol das molekulare Gewicht von Calcium darstellt und sich die Einwaage auf das Gewicht der Knochenasche nach der Veraschung im Muffelofen bezieht:

$$Ca[\frac{mg}{g}] = \frac{40,08[\frac{g}{mmol}] \cdot Messwert[\frac{mmol}{l}] \cdot Verd.[ml]}{1000 \cdot Einwaage[g]}$$

### Phosphorbestimmung

Der Phosphorgehalt der Knochen wurde mittels Photometer (SPEKTRALPHOTOMETER GENESYS 10 UV, THERMO SPECTOTRONIC, USA) bestimmt. Um die Proben der Knochenaschelösung für die Messung vorzubereiten, wurde in 12 ml-PP-Rundbodenröhrchen (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht) 1 ml Trichloressigsäure (TCA) vorgelegt, 50 µl der Aschelösung in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben und anschließend mit einem Vortex (VORTEX MIXER MS2 MINISHAKER, IKA WERKE GmbH & Co. KG, Staufen) durchmischt. Nach Zugabe von 2 ml einer Mischung aus Ammoniummolybdat- und AmmoniumvanadatLösung (Mischungsverhältnis 1:1) wurde erneut mit dem Vortex gemischt und die Probe 10 min inkubiert. Nach der Blindwerteinstellung erfolgte die Messung der Proben bei 366 nm in Messküvetten (Plastibrand® Einmalküvetten 2,6 ml makro PS, Art. Nr. 759005, BRAND, Wertheim).

Bei der Photometrie wird die Durchlässigkeit der Probe mit weitgehend monochromatischem Licht bestimmt. Durch das vorherige Messen eines Nullwertes (ohne Probe) wird die Durchlässigkeit auf 100 % eingestellt. Gibt man zu einer Phosphorlösung enthaltenden, salpetersauren Lösung in der Kälte Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat, so entsteht ein orange-gelb gefärbter Komplex, dessen Intensität der Phosphorsäuremenge entspricht. Diese Färbung kann als Extinktion bei 366 nm im Photometer gemessen werden.

Der Phosphorgehalt der Knochen ergab sich aus folgender Formel, wobei der Wert 10,5 ein empirischer Wert und der Wert 0,34 [g/mmol] die Standardkonzentration darstellt. Die Einwaage bezieht sich auf das Gewicht der Knochenasche nach der Veraschung im Muffelofen:

$$P[\frac{mg}{g}] = \frac{10,5 \cdot Messwert \cdot Verd.[ml]}{0,34[\frac{g}{mmol}] \cdot 100 \cdot Einwaage[g]}$$

## 3.9 Bestimmung der Organparameter

Von allen Tieren wurden am Versuchsende, wie oben schon beschrieben, unter anderem Gewebeproben von Niere, Muskel, Leber, Fett und Haut entnommen.

Diese Organe wurden, wie schon das Plasma, für die Untersuchung auf 25-



Hydroxycholecalciferol zu DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) geschickt.

Vom Nierenmaterial erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Trockensubstanz, des Asche- und des Calciumgehalts.

#### **3.9.1 25-Hydroxycholecalciferol**

Das Nachweisverfahren für 25(OH)D<sub>3</sub> wurde, wie bereits unter 3.7.5 dargestellt, von den Laboratorien der DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) durchgeführt.

#### **3.9.2 Untersuchung des Nierenmaterials**

Die linke Niere wurde, um eine bessere Homogenität zu gewährleisten, vor der weiteren Untersuchung von ihrer Kapsel befreit und mit Hilfe eines Mixstabes (Heidolph Silent Crusher M) zu einem gleichmäßigen Brei zerkleinert.

##### **Trockensubstanz der Niere**

Der zuvor hergestellte Organbrei wurde gleich im Anschluss an die Homogenisierung in Porzellantiegel (HCT 101/50 DIN) eingewogen und daraufhin für ca. 7 Tage bei 103°C bis zur Gewichtskonstanz in den Trockenschrank verbracht und anschließend erneut gewogen. Die Trockensubstanz ergab sich nach Abzug des Leergewichts des Porzellantiegels.

##### **Veraschung der Niere**

Auch diese Veraschung fand im Muffelofen statt, da die Proben für einen Aufschluss im Mikrowellenverfahren zu groß waren. Die schon für die Bestimmung der Trockensubstanz in Porzellantiegel eingewogenen Proben konnten ohne weitere Bearbeitung in den Muffelofen verbracht werden. Innerhalb von 5 Stunden wurde der Ofen langsam und gleichmäßig bis zum Erreichen der endgültigen Temperatur von 550°C aufgeheizt. Anschließend verblieben die Proben dort für 72 Stunden bei 550°C. Die erhaltene Asche wurde in ca. 7 ml 37%iger Salzsäure gelöst, verschließbare 12 ml-Röhrchen (SARSTEDT, Nümbrecht) überführt und mit Reinstwasser bis zur 12 ml-Skalierung aufgefüllt.

### Calciumbestimmung der Niere

Ebenso wie bei der bereits oben aufgeführten Calciumbestimmung der Knochen, fand die Ca-Analyse der Niere statt. Für die Messung konnten die Lösungen aus der Veraschung im Muffelofen ohne weitere Verdünnung verwendet werden. Der Calciumgehalt ergab sich auch hier aus folgender Formel:

$$Ca[\frac{mg}{g}] = \frac{40,08[\frac{g}{mmol}] \cdot Messwert[\frac{mmol}{l}] \cdot Verd.[ml]}{1000 \cdot Einwaage[g]}$$

## 3.10 Bestimmung der Urinparameter

Der Urin wurde jeweils am Tag der Euthanasie entnommen. Nach Möglichkeit geschah dies mittels Cystocentese mit sterilen Einmalkanülen (SUPRA Einmal-Kanülen mit Lanzettenschliff, 2.00 x 80 mm, Ehrhardt Medizinprodukte GmbH, Geislingen) und 10 ml-Spritzen (Norm-Ject, Henke Sass Wolf, Tuttlingen) unter Ultraschallkontrolle. Durch die Muskeler schlaffung nach dem Tode, setzten allerdings manche Tiere unkontrolliert Urin ab, so dass dieser nur noch mit einem Becher aufgefangen werden konnte und deshalb nicht mehr steril war. Manche Tiere setzten auch auf Grund des Stresses schon vor der Euthanasie in der Box den Urin ab, so dass von diesen Tieren kein Untersuchungsmaterial gewonnen werden konnte.

Noch am Tag der Entnahme wurde die Urinstick-Schnelldiagnostik und makroskopische Untersuchung durchgeführt und der Urin gleich im Anschluss, abgefüllt in verschließbare 12 ml-Röhrchen (SARSTEDT, Nümbrecht), bei -20°C tiefgefroren. Für die weiteren Bestimmungen wurde der Urin jeweils kurz vorher bei Zimmertemperatur aufgetaut und sofort analysiert.

### 3.10.1 Urinstick-Schnelldiagnostik und makroskopische Untersuchung

Die Bestimmung der Parameter erfolgte noch am Tag der Euthanasie mit frischem Urin, da dieser für die Stickuntersuchung nicht länger als 4 Stunden gestanden haben soll.

#### Urinstick-Schnelldiagnostik

Für diese Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines semiquantitativen Testverfahrens. Dafür wurden Urinsticks (HENRY SCHEIN®, Urispec PLUS, Item code: 900-2622) kurz (für ca. 2 sec.) in die Urinprobe eingetaucht, wobei darauf zu achten war, dass alle Testfelder benetzt waren. Über-

schüssiger Urin wurde über die Kante des Streifens am Rand des Sammelgefäßes abgestreift. Während der Inkubationszeit von 60 sec. (Leukozyten 60-120 sec.) war darauf zu achten, dass die Teststreifen waagrecht gehalten werden, um Interferenzen zwischen den Reaktionszonen zu vermeiden. Die Reaktionsfarben wurden daraufhin mit der Farbskala der Stick-Dose verglichen und somit eine visuelle, semiquantitative Auswertung vorgenommen. Somit konnten folgende Parameter untersucht werden:

- Bilirubin [-/+]
- Urobilinogen [mg/dl]
- Keton [-/+]
- Glucose [mg/dl]
- Protein [mg/dl]
- Blut [Ery/ $\mu$ l]
- Nitrit [-/+]
- pH [5-9]
- Dichte/spezifisches Gewicht [1000-1030]
- Leukozyten [Leuko/ $\mu$ l]

#### **Makroskopische Untersuchung**

Zeitgleich mit der Stickuntersuchung erfolgte die Bestimmung von Farbe, Geruch, Transparenz und Beimengungen des Urins. Dabei wurde vor allem auf Verfärbungen (z.B. rötlich durch eventuelle Blutbeimengungen) und Beimengungen geachtet.

#### **3.10.2 Calcium-, Phosphor- und Kreatininbestimmung im Urin**

Bei Messgrößen mit stark schwankender Urinausscheidung ist es von Vorteil, die gemessene Konzentration nicht auf ein bestimmtes Urinvolumen, sondern auf die gleichzeitig gemessene Kreatininkonzentration zu beziehen, die weitgehend unabhängig von der Harnmenge ist. Der Urin-Kreatinin-Gehalt wird als fixe Bezugsgröße für andere Harnmessgrößen herangezogen,

um dadurch besser quantitative und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Als eigene Messgröße ist der Wert wenig aussagekräftig.

#### **Calcium- und Phosphorbestimmung**

Wie bei der bereits oben genannten Mineralstoffbestimmung von Calcium und Phosphor der Knochen, erfolgte die Messung auch im Urin mit denselben Geräten.

Vor der Untersuchung wurde der Urin 1:1 mit Salzsäure verdünnt und dadurch angesäuert, um eventuelle Calciumsalze zu lösen. Anschließend wurde die Probe zur Vermeidung möglicher Präzipitate zentrifugiert und in 1,5 ml Eppendorfcups aliquotiert. Aus dieser Lösung konnten dann mittels der bereits oben beschriebenen Geräte (Flammenphotometer, Spektralphotometer) die Mineralstoffe Calcium und Phosphor gemessen werden.

#### **Kreatininbestimmung**

Zur Durchführung wurden folgende Materialien und Geräte benötigt:

- Mikrotiterplatten mit je 96 Kavitäten, Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
- Creatinin Assay KIT *Metra*®, OSTEOMEDICAL GmbH, Bünde, bestehend aus 3 Creatinin-Standards mit 5, 20 und 40 mmol/l Urin-Puffer-Matrix, 1 Creatinin Low Control sowie 1 Creatinin High Control, Farbreagenz: 14 ml 0,14% Pikrinsäure + 2 ml NaOH
- Multipipette, Firma EPPENDORF, Hamburg
- Assay Reader Sunrise Remote, TECAN, Crailsheim

Die Kreatininbestimmung im Urin basiert auf einem modifizierten Verfahren nach Jaffé aus dem Jahre 1886. Hierbei reagiert alkalische Pikrinsäure mit Kreatinin unter Bildung eines gelben Farbkomplexes, dessen optische Dichte direkt proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe ist, und diese somit photometrisch gemessen werden kann.

Nachdem auf die erste Mikrotiterplatte 190 µl Reinstwasser und 10 µl Urin aufgetragen wurden, wurde mit Hilfe zweier weiterer Mikrotiterplatten eine Verdünnungsreihe erstellt, sodass in der dritten Platte der Urin in einer Verdünnung von 1:40 vorlag. Nach Zugabe der 0,14%igen Pikrinsäure und einer 30 minütigen Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung bei 490 nm mit einem ELISA-Plattenleser.

### 3.10.3 Mikroskopische Untersuchung des Urins

Bei dieser Untersuchung wurde vor allem auf die nicht-löslichen Bestandteile des Urins (Blutzellen, Epithelien, Harnzylinder, Krankheitserreger, Kristalle und Zelldetritus) geachtet.

Um die festen Bestandteile des Urins mikroskopisch besser beurteilen zu können, wurde dieser durch die Herstellung eines Harnsediments aufbereitet. Dabei wurden von jedem Tier 2 ml Urin bei 2000 U/min für 5 min in eine Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R) verbracht, der Überstand verworfen und ein Tropfen des Sediments auf einen Objektträger pipettiert. Zur Betrachtung wurde der Tropfen unbehandelt abgedeckt und in einem Lichtmikroskop (Leica WILD M3Z) mit dem 40er-Objektiv angeschaut. Es wurden ca. 20 Blickfelder betrachtet und bei den Kristallen der Durchschnitt der gesehenen Objekte notiert.

### 3.10.4 pH-Wert-Bestimmung des Urins

Der pH-Wert des Harns wurde durch elektrometrische Messung mittels digitalem pH-Meter nach vorheriger Eichung des Gerätes eruiert. Bei dem verwendeten Messgerät handelte es sich um das pH 325 WTW Mess- und Analysegeräte GmbH (Wien, Österreich), mit der pH-Elektrode Sen Tix 97/T WTW Mess- und Analysegeräte GmbH (Wien, Österreich).

Zur Bestimmung wurde die Sonde des Gerätes direkt in den kurz zuvor aufgetauten Urin getaucht, welcher zum Zeitpunkt des Messens eine Temperatur von 20-22°C hatte. Nachdem ein konstanter Wert erreicht war, wurde dieser notiert. Sowohl vor, als auch nach jeder Analyse wurde die Sonde mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in Kaliumchlorid getaucht gelagert.

### 3.10.5 Spezifisches Gewicht des Urins

Das Spezifische Gewicht zeigt die Konzentration löslicher Substanzen im Urin an. Man erhält daraus einen Hinweis auf die Wasserrückresorptionsfähigkeit des Tubulussystems. Das spezifische Gewicht des Urins wurde mit Hilfe eines Handrefraktometers (Leo Kübler GmbH, 7500 Karlsruhe) gemessen, unter Verwendung des kurz zuvor aufgetauten Urins. Für diese Untersuchung wurde mit einer Pipette jeweils soviel Harn aus den Röhrchen entnommen, dass die Messfläche des Refraktometers damit vollständig benetzt werden konnte, anschließend das Refraktometer gegen eine Lichtquelle gehalten und das Ergebnis an der nun sichtbaren Skala abgelesen. Nach jeder Untersuchung erfolgte eine gründlich Reinigung der Meßfläche.

## 3.11 Bestimmung der Kotparameter

Am Ende des Versuchs wurden von jeder Bucht Sammelkotproben genommen und anschließend weiter untersucht.

### 3.11.1 Optische Parameter des Kotes

Die optischen Parameter des Kotes wurden sowohl während des Versuchs, als auch am Versuchsende erfasst. Hierbei wurde vor allem auf Farbe, Konsistenz und eventuelle Beimengungen, wie Blut oder zelluläre Bestandteile geachtet.

### 3.11.2 Parasitologische Untersuchung des Kotes

Am Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Veterinärwissenschaftliches Departement der LMU München, wurde eine Flotation auf Magen-Darmparasiten und eine MIFC (Merthiolat-Jod-Formalin-Concentration) auf Giardien durchgeführt. Das Flotationsverfahren mit einer gesättigten Salz- oder Zuckerlösung hat den Nachteil, dass die Flotation sofort mikroskopiert werden muss, da die Oozysten durch die gesättigte Flotationslösung austrocknen und zerstört werden. Dieses Verfahren kann deshalb aus arbeitstechnischen Gründen für den Giardien-Nachweis nicht empfohlen werden.

#### Flotationsverfahren

Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einer Anreicherung von Wurmeiern mit einer geringen Dichte, die in Lösungen mit höherem spezifischem Gewicht an der Oberfläche schwimmen.

Für die Untersuchung wurden ca. 3 g Kot in einer Petrischale mit der Flotationsflüssigkeit (Zinkchlorid-Kochsalz-Lösung) gut vermischt und die Aufschwemmung anschließend mit Hilfe eines Trichters durch ein Sieb (Maschenweite 300  $\mu m$ ) in ein Zentrifugenröhrchen gegossen. Danach wurde der Oberflächenmeniskus von Luftblasen befreit und ein Deckgläschen aufgesetzt. Dieser Schritt kann auch, nach Zentrifugieren der Flotationsflüssigkeit, durch eine Probenentnahme an der Flüssigkeitsoberfläche mit einer Öse ersetzt werden. Zentrifugiert wird dabei 3 Minuten lang bei 1500 - 2000 U/min.

Das Deckgläschen wurde auf einen Objektträger überführt, bzw. das Probenmaterial der Öse, und bei 100facher Vergrößerung unter dem Mikroskop untersucht.

## **MIFC**

Das MIFC-Verfahren ist gut geeignet, um Rund-, Saug- und Bandwurmeier, sowie alle Protozoen-Oozysten und Wurmlarven anzureichern, und stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber der herkömmlichen Flotation dar.

Bei dem MIFC-Verfahren handelt es sich um ein modifiziertes Sedimentationsverfahren. MIFC steht für Merthiolat-Jod-Formalin-Concentration und wird vom Bundesministerium für Gesundheit als Methode der Wahl empfohlen. Eine kirschgroße Kotmenge wurde mit der Formalin-Merthiolat-Lösung und Ethylenazetat gut gemischt und dann abzentrifugiert. Der Überstand aus MIFC-Lösung, Ethylenazetat und groben Kotbestandteilen wurde verworfen und im Sediment waren dann die Oozysten angereichert. Durch das Formalin erfolgt eine Stabilisation der Oozystenmembran und durch das Jod erschien der Oozysteninhalt leicht angefärbt. Das Sediment wurde auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckgläschen abgedeckt, und dann das gesamte Deckgläschen mit dem 20er- bzw. 40er-Objektiv durchgemustert. Die Identifizierung erfolgte anhand der Morphologie.

## **3.12 Bestimmung der Futterparameter**

Hierfür wurden von jedem frisch angebrochenen Futtersack einer Versuchsgruppe je eine Probe von ca. 500 g entnommen. Diese Einzelproben wurden am Ende zusammengemischt und zerkleinert, um eine möglichst hohe Homogenität zu erreichen.

### **3.12.1 Weender-Analyse**

Das in Weende bei Göttingen 1864 von Henneberg und Strohmann entwickelte Verfahren der chemischen Futtermittelanalyse stellt auch heute noch eine Grundlage der Futtermittelanalytik dar und dient zur Bestimmung der Nährstoffe. Hierbei wird der Gehalt an Rohwasser/Trockensubstanz, Rohprotein, Rohfett, Rohfaser und Rohasche ermittelt; im vorliegenden Versuch von den vier verschiedenen Futtermischungen (T1-T4).

#### **Trockensubstanz-Bestimmung**

Zur Bestimmung der Trockensubstanz des Futters wurden von den homogenisierten Proben jeweils 10-13 g in Aluschälchen (NEOLAB, Heidelberg) eingewogen und bis zur Gewichtskon-

stanz bei 103°C in den Trockenschrank verbracht. Die Trockensubstanz in % der ursprünglichen Substanz setzt sich aus sämtlichen nichtflüchtigen Bestandteilen des Futters zusammen.

#### **Rohprotein-Bestimmung**

Zur Durchführung wurden folgende Materialien und Geräte benötigt:

- Foss Kjelttec 2400, Dispenser 0-25 ml, FOSS, Hamburg
- Schwefelsäure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%ig, Art.Nr. 100748, MERCK, Darmstadt
- Natronlauge NaOH 21%ig, Art.Nr. 105593, MERCK, Darmstadt
- Natronlauge NaOH 32%ig, Art.Nr. 105590, MERCK, Darmstadt
- Salzsäure HCl 0,2n, Art.Nr. 113134, MERCK, Darmstadt
- Borsäurelösung 1%ig, Art.Nr. 100160, MERCK, Darmstadt
- Kjeltabs Cu/3,5 (3,5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,4 g CuSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O), VWR INTERNATIONAL GmbH, Wien, Österreich

Die Bestimmung des Rohproteins erfolgte nach dem Prinzip des Kjeldahlverfahrens, bei dem der gesamte, im Futter enthaltene organisch gebundene Stickstoff ermittelt wird. Anschließend wurde der Proteingehalt in % mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors (N x 6,25) berechnet.

Zur Durchführung wurden 0,5 bis 1 g Futter in seiner ursprünglichen Substanz eingewogen, und ein bis zwei Kjeltabs und 15 ml konzentrierte Salzsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mit dem Dispenser zugegeben. Danach wurde die Probe bei 380°C im Aufschlussblock gekocht, wobei der Stickstoff (N) in Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) übergeht. Im anschließenden Destillierprozess wurde der Stickstoff (N) unter Zugabe von Natronlauge (NaOH) als Ammoniak (NH<sub>3</sub>) in eine Vorlage aus Borsäure (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) überführt. Durch Titration konnte daraufhin mit Salzsäure (HCl) der Ammoniumhydroxid (NH<sub>4</sub>OH)-Gehalt der Vorlage ermittelt und so die Stickstoffmenge erfasst werden. Die Umrechnung von Stickstoff auf % Rohprotein erfolgte automatisch.

#### **Rohfett-Bestimmung**

Zur Durchführung wurden folgende Materialien und Geräte benötigt:

- Soxtec Avanti 2050, FOSS, Hamburg



- Soxlet-Hülsen, FOSS, Hamburg
- Siedesteinchen (Glasperlen), bezogen von VWR INTERNATIONAL GmbH, Wien, Österreich
- Petrolether (40-60° C), Art-Nr. T173.3, ROTH, Karlsruhe
- Trockenschrank Heraeus Funktion Kine, KENDRO, Langenselbold
- Glasmörser (AH00 STAATL. Berlin)
- Exsikkator aus Glas, bezogen von VWR INTERNATIONAL GmbH, Wien, Österreich

Von den in einem Mörser zerkleinerten Futterproben wurden per Analysenwaage 1 bis 2 g mit Hilfe eines Hülsenträgers in die Filterhülsen eingewogen. Der untere Topf mit drei Siedesteinchen wurde ebenfalls gewogen. Anschließend wurden die Probegefäße in den Fettextractor gestellt, die Extraktionshülsen mit 80 ml Petrolether befüllt und mit der Programmeinstellung 1 bei 135° C extrahiert. Es folgte eine Trocknung des Probenmaterials über 60 min bei 103° C im Trockenschrank, mit anschließender Abkühlphase im Exsikkator. Durch die entstandene Gewichts Differenz konnte das Rohfett in % bestimmt werden.

#### **Rohfaser-Bestimmung**

Zur Durchführung wurden folgende Materialien und Geräte benötigt:

- Foss Fibertoc hot extractor 2010, FOSS, Hamburg
- Fibertoc cold extractor 1021, FOSS, Hamburg
- Glasfiltertiegel mit eingeschmolzenem gesintertem Glasfilter, FOSS, Hamburg
- Filtrationshilfsmittel: Celite 545, Art.Nr. 102693, MERCK, Darmstadt
- Antischaummittel Octanol, Art.Nr. 100991, MERCK, Darmstadt
- Schwefelsäure 1,25%ig, Art.Nr. 109912, MERCK, Darmstadt
- Kalilauge 1,25%ig, Art.Nr. 109918, MERCK, Darmstadt
- Bidestilliertes Wasser, Reinstwasseranlage der Serie ULTRA CLEAR, SG WASSERAUFBEREITUNG UND REGENERIERSTATION GmbH, Barsbüttel

- Trockenschrank Heraeus Funktion Kine, KENDRO, Langenselbold
- Muffelofen Controller P320 30-3000°C, NABERTHERM, Lilienthal
- Exsikkator aus Glas, bezogen von VWR INTERNATIONAL GmbH, Wien, Österreich

Für die Bestimmung der Rohfaser wurden die getrockneten Futterproben aus der Trockensubstanzbestimmung verwendet. Nach dem Wiegen der leeren Fritten erfolgte die Futtereinwaage von ca. 1 g (auf 0,1 mg genau) und als Filtrationshilfsmittel wurde jeder Probe etwa 0,2 g (auf 0,1 mg genau) Celite zugegeben.

Es folgte ein Kochvorgang im Fibertec hot extractor mit Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,25%ig) und anschließend mit Kalilauge (KOH, 1,25%ig). Um das Aufschäumen der Proben zu verhindern, wurde bei jedem Anzeichen von Schaumbildung 1 Tropfen Octanol zugegeben. Nach Beendigung der beiden Kochgänge erfolgte eine Reinigung der Glasfiltertiegel mit Reinstwasser und anschließend eine Trocknungsphase von 1 Stunde bei 103°C im Trockenschrank. Um der Kondenswasserbildung vorzubeugen und damit die Gewichtskonstanz beizubehalten, erfolgte die Abkühlung der Glasfiltertiegel über einen Zeitraum von 30 Minuten im Exsikkator. Anschließend wurden die Futterproben mit der Analysenwaage gewogen und im Muffelofen bei 550°C verascht. Durch die Differenz der Glasfiltertiegel mit der Futtereinwaage als Trockensubstanz vor der Analyse, und dem Gewicht des Glasfiltertiegels nach der Veraschung im Muffelofen, abzüglich der Celiteeinwaage, errechnete sich die Rohfasermenge im Futter.

#### **Rohasche-Bestimmung**

Das Futter in seiner ursprünglichen Substanz wurde in Porzellantiegel eingewogen und im Muffelofen bei 550°C über einen Zeitraum von 36 Stunden verascht. Die entstandene Rohasche wurde gewogen und als Prozentwert der ursprünglichen Substanz berechnet.

#### **3.12.2 Calcium-, Phosphor- und Natriumgehalt des Futters**

Wie bei der bereits oben genannten Mineralstoffbestimmung von Calcium und Phosphor in Knochen und Urin, erfolgte die Messung auch im Futter mit denselben Geräten.

Die Futterproben wurden im Muffelofen bei 550°C über 36 Std. verascht und anschließend in etwa 5 ml 37%iger HCL gelöst und auf 10 ml mit deionisiertem Reinstwasser verdünnt. Mittels der bereits oben dargestellten Geräte (Flammenphotometer, Spektralphotometer) konnten aus diesen Lösungen die Mineralstoffe Calcium und Phosphor gemessen werden.

### Natriumbestimmung

Die Natriumbestimmung im Futter erfolgte, wie die Calciumbestimmung, mit Hilfe eines Flammenphotometers (EFOX 5053, EPPENDORF, Hamburg). Hierzu wurde die Aschelösung in 1,5 ml Eppendorfcups aliquotiert und anschließend gemessen.

Der Natriumgehalt ergab sich aus folgender Formel, wobei der Wert 22,99 g/mmol das molekulare Gewicht von Natrium darstellt und sich die Einwaage auf das Gewicht der Futterasche nach der Veraschung im Muffelofen bezieht:

$$Na[\frac{g}{kg}] = \frac{22,99[\frac{g}{mmol}] \cdot Messwert[\frac{mmol}{l}] \cdot Verd.[ml]}{1000 \cdot Einwaage[g]}$$

### 3.12.3 Stärke- und Gesamtzuckergehalt des Futters

Diese Untersuchungen wurden von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt LUFA-ITL GmbH Kiel durchgeführt.

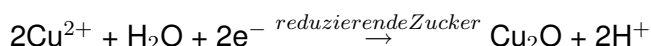
#### Stärkegehalt

Die Bestimmung des Stärkegehaltes erfolgte polarimetrisch (§ 64 LFGB L 17.00-5). Das Polarisometer dient zur Bestimmung der Drehung der Polarisationssebene des Lichts in optisch aktiven Lösungen. Seine wesentlichen Konstruktionselemente sind ein Polarisator, der sich vor der Probe befindet, und ein Analysator hinter der Probe, die sich gegeneinander verstellen lassen. Auf diese Weise lässt sich der Drehwinkel der Schwingungsebene beim Durchgang durch optisch aktive Substanzen bestimmen.

#### Gesamtzuckergehalt

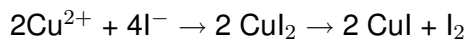
Der Gesamtzuckergehalt wurde nach Inversion (Hydrolyse) durch die Methode nach Luff-Schoorl (amtliche Methode, VDLUFA III 7.1.1) analysiert.

Diese Messung beruht auf einer reduktometrischen Reaktion. Reduzierende Zucker können  $Cu^{2+}$ -Ionen zu  $Cu^+$  reduzieren, während sie selbst oxidiert werden.

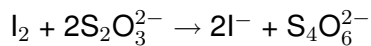


$Cu_2O$  fällt als Niederschlag aus. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, indem die Glucoselösung

mit einer definiert hergestellten Kupfer(II)-Ionen-haltigen, carbonatalkalischen Lösung (Luffsche Lösung) versetzt und erhitzt wird. Die reduzierten Kupferionen fallen dann als  $\text{Cu}_2\text{O}$  aus. Nun wird der noch vorhandene Überschuss an  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen iodometrisch bestimmt. Sie bilden aus im Überschuss zugesetztem Kaliumiodid zuerst  $\text{CuI}_2$ , bevor daraus das unlösliche  $\text{CuI}$  und  $\text{I}_2$  entstehen.



Die Iodmoleküle werden anschließend durch  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  zu  $\text{I}^-$ -Ionen reduziert.



Wenn eine Probelösung keine reduzierenden Substanzen enthält, ist die Konzentration an Kupfer(II)-Ionen maximal. Demnach entsteht auch eine maximale Menge an  $\text{I}_2$ , die den höchstmöglichen Verbrauch an Thiosulfat ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) verursacht. Ist in der Probe dagegen viel Glucose vorhanden, wird eine große Menge  $\text{Cu}^{2+}$  reduziert, d.h. es entstehen weniger Iodmoleküle  $\text{I}_2$ ; der Verbrauch an  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  ist geringer.

#### 3.12.4 Bestimmung der Energiedichte des Futters

Der Bruttoenergiegehalt (GE = gross energy) wird durch Verbrennung im Bombenkalorimeter (IKA-Werke Staufen, C 2000 Basic) bestimmt. Der Bombenkalorimeter dient zur Bestimmung des Brennwertes eines Stoffes unter Sauerstoffatmosphäre und hohem Druck. Hierzu wird in einem mit temperiertem Wasser gefüllten Stahlcontainer, der als adiabat (thermodynamischer Vorgang, bei dem ein System von einem Zustand in einen anderen überführt wird, ohne thermische Energie mit seiner Umgebung auszutauschen) angenommen werden kann, eine sogenannte Bombe eingelassen. In der Bombe herrscht eine Sauerstoffatmosphäre unter einem Druck von 20–30 bar. Der zu bestimmende Stoff wird in einem Tiegel in der Bombe platziert und durch einen Lichtbogen gezündet und verbrannt. Durch die Messung der Erwärmung des Bombenkalorimeters kann auf den Brennwert geschlossen werden.

Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von Frau Stadler an der Außenstelle Oberwiesenfeld des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik, Veterinärwissenschaftliches Department der LMU München durchgeführt.

### 3.12.5 Bestimmung von 25-Hydroxycholecalciferol im Futter

Das Nachweisverfahren für 25(OH)D<sub>3</sub> wurde wie bereits unter 3.7.5 erläutert von den Laboratorien der DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) durchgeführt.

## 3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SIGMASTAT, Version 3.0, SYSTAT SOFTWARE Inc., Richmond, CA, USA.

Die daraus resultierenden Ergebnisse werden als arithmetischer Gruppenmittelwert und der dazugehörigen Standardabweichung ( $\bar{x} \pm \sigma$ ) angegeben.

Die durchgeführten Vergleichsuntersuchungen zwischen den Gruppen erfolgte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (One way ANOVA), wobei die unterschiedlichen Gruppen (T2-T4) versus der Kontrollgruppe (T1) verglichen wurden. Hierbei kam die Dunn's Methode für nicht verbundene Stichproben zur Anwendung. Wurde dabei ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe gefunden, wurde für jedes Gruppenpaar p angegeben.

Dabei steht p für die Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. wenn  $p < 0,05$  ist, liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5%, und zwischen den beiden verglichenen Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied.

Mittelwerte, die sich signifikant unterschieden, wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  mit einem \* gekennzeichnet.

Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen besteht für  $p > 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gesundheitsstatus

Der Gesundheitsstatus der Tiere wurde täglich kontrolliert und Auffälligkeiten dokumentiert. Zusätzlich fand einmal pro Woche eine klinische Untersuchung jedes Ferkels statt.

Ferkel 17, aus Gruppe T3, zog sich 14 Tage nach der Aufstallung eine Schnittwunde am linken Ohrgrund zu. Diese Wunde wurde an der Klinik für Schweine, Tierklinisches Department der LMU München, unter Narkose [Ketamin (*Ursotamin*®) 15 mg/kg KG, Azaperon (*Stresnil*®) 2 mg/kg KG und Isofluran 1,5 Vol%] gereinigt und genäht. Noch am selben Tag, sowie an den 5 Folgetagen erhielt das Tier Meloxicam (*Metacam*®) 0,5 mg/kg KG und Cefquinom (*Cobactan*®) 2 mg/kg KG gegen die Wundinfektion. Da am Tag 21 die Wunde immer noch stark eitrig und die Wundränder eingerissen waren, wurde das Tier zur erneuten Wundrevision in die Klinik für Schweine gebracht. Diese Behandlung erfolgte ebenfalls unter Narkose [Ketamin (*Ursotamin*®) 15 mg/kg KG, Azaperon (*Stresnil*®) 2 mg/kg KG und Isofluran 1,5 Vol%]. Zur weiteren Behandlung wurde parenteral über 4 Tage Meloxicam (*Metacam*®) 0,5 mg/kg KG und Enrofloxacin (*Baytril*® 2,5%) 2,5 mg/kg KG verabreicht. Die Wunde heilte daraufhin ohne weitere Komplikationen aus. Das Ferkel war über den gesamten Behandlungszeitraum bei gutem Allgemeinbefinden.

Mehrere Schweine, vornehmlich aus Gruppe T3, zeigten 16 Tage nach Versuchsbeginn ein struppiges Haarkleid und wässrig-gelb-braunen Durchfall. Deshalb wurden Kotproben von verschiedenen erkrankten Tieren zur Untersuchung an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Veterinärwissenschaftliches Department der LMU München übersandt. Wegen des schlechten Gesundheitszustandes mehrerer Ferkel erfolgte sofort eine vorläufige Behandlung. Auf Grund des Verdachtes einer Coronavirusinfektion, erhielten alle Tiere zur Unterstützung der Abwehr und zur Ausschaltung möglicher Sekundärinfektionen eine Behandlung mit Tiamulinfumarat (*Tiamutin*® 10% oral) 10 mg/kg über das Futter. Die Tiere mit schlechtem Allgemeinbefinden erhielten auf Grund der verminderten Futteraufnahme zusätzlich parenteral verabreichtes Tiamulin (*Tiamutin*® 10% pro inj.) 12 mg/kg KG.

In der mikrobiellen Untersuchung (aerob) konnten hämolysierende E.-coli und andere Enterobakterien, aber keine Salmonellen nachgewiesen werden. Dem Ergebnis des Antibio-gramms entsprechend, erhielten alle Tiere über 7 Tage eine orale Behandlung mit Colistinsulfat (*Animedistin®* 12% N) 5 mg/kg KG und die Tiere mit schlechtem Allgemeinbefinden zusätz-lich einmalig Dexamethason-21-isonicotinat (*Voren-Suspension®*) 0,02 mg/kg KG parenteral und über sieben Tage Enrofloxacin (*Baytril®* 2,5%) 2,5 mg/kg KG parenteral. Die Symptome verschwanden daraufhin vollständig.

Ferkel 45, aus Gruppe T3, verstarb 18 Tage nach der Einstellung infolge der E.-coli-Erkrankung und wurde bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C eingefroren.

Ferkel 5, aus Gruppe T3, verletzte sich 17 Tage nach Versuchsbeginn ebenfalls am linken Ohrgrund. Diese Verletzung ähnelte dem Ohrschnitt von Ferkel 17. Da die Wunde aber nicht so tief war, genügte eine 5-tägige, konservative Behandlung mit Cefquinom (*Cobactan®*) 2 mg/kg KG und einem filmbildenden Aluminium-Mikronisat-Spray. Die Verletzung heilte ohne weitere Komplikationen ab.

Über den gesamten Versuchszeitraum konnten keine auf die 25-Hydroxycholecalciferol-Fütterung zurückzuführenden Symptome festgestellt werden.

## 4.2 Mastleistungsparameter

Die Tiere wurden zu Beginn des Versuchs, einmal wöchentlich über den gesamten Versuchs-zeitraum, und am Versuchsende gewogen.

In den ersten 9 Tagen erhielten die Tiere eine restriktive Fütterung, um futterumstellungsbe-dingte Durchfallerkrankungen zu verhindern. Die Tiere bekamen dabei je zwei Mahlzeiten pro Tag. Ab dem 10. Tag wurde der Fütterungsmodus auf ad-libitum-Fütterung umgestellt.

Die Mastleistung der Schweine wurde mit Hilfe der Parameter durchschnittliche tägliche Futteraufnahme, durchschnittliche tägliche Zunahme und durchschnittlicher Futteraufwand je Kilogramm Lebendmassezunahme ermittelt.

Die statistische Untersuchung ergab keine signifikanten Unterschiede der 25-Hydroxycholecalciferolgruppen T2-T4 für die untersuchten Mastleistungsparametern im Vergleich zur Kontrollgruppe T1.

Das vorzeitig verstorbene Tier 45 wurde nicht in die statistischen Berechnungen mit einbezogen, woraus folgende Probenzahl resultiert:

**Kontrolle T1** n=12

**Gruppe T2** n=12

**Gruppe T3** n=11

**Gruppe T4** n=12

#### 4.2.1 Futteraufnahme

In Tabelle 4.1 sind die gesamte Futteraufnahme über den Versuchszeitraum von 42 Tagen und die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme pro Tier angegeben.

Die Futteraufnahme der Gruppe T2 war im Vergleich zu den anderen Gruppen mit einer Gesamtmenge von 29,85 kg und einer täglichen Futteraufnahme von 711 g/d am Höchsten. Die anderen 3 Gruppen bewegten sich in einem ähnlichen Rahmen. Alle Versuchsgruppen wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf.

#### 4.2.2 Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung

Zu Beginn des Versuches hatten die Versuchstiere ein durchschnittliches Gewicht von 9,1 kg ( $\pm 0,93$  kg). Am Versuchsende waren die Tiere der Gruppe T2 mit einem durchschnittlichen Gewicht von 27,71 kg ( $\pm 5,04$ ) am Schwersten. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte jedoch kein statistisch signifikanter Gewichtsunterschied der Gruppen T2, T3 und T4 gegenüber der Kontrollgruppe T1 festgestellt werden.

In Tabelle 4.2 ist die durchschnittliche Entwicklung der Körpergewichte dargestellt.

Die durchschnittlichen Gesamtzunahmen der Einzeltiere im Versuchszeitraum (Tag 0-42) [kg] und die durchschnittlichen täglichen Zunahmen [g/d] der Einzeltiere der verschiedenen Versuchsgruppen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Die aus Futteraufnahme und Lebendmassezunahme errechnete Futtermittelverwertung [kg/kg] pro Tier geht ebenfalls aus Tabelle 4.3 hervor.



Tabelle 4.1: Gesamte Futteraufnahme über den Versuchszeitraum von 42 Tagen und durchschnittliche tägliche Futteraufnahme (pro Tier)

	<b>Futteraufnahme gesamt</b> kg x	<b>Tägliche Futteraufnahme</b> g x
<b>Kontrolle T1</b>	27,70	660
<b>Gruppe T2</b>	29,85	711
<b>Gruppe T3</b>	27,15	646
<b>Gruppe T4</b>	27,05	644
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1		

Tabelle 4.2: Mittlere Körpermasse [kg] (MW±SD) der Tiere im Versuchsverlauf

		<b>Tag 1</b>	<b>Tag 8</b>	<b>Tag 15</b>	<b>Tag 22</b>	<b>Tag 28</b>	<b>Tag 36</b>	<b>Tag 42</b>
<b>Kontrolle T1</b>	$\bar{x}$	9,09	10,17	12,23	14,53	17,40	22,31	26,42
	$\sigma$	± 0,95	± 1,18	± 2,13	± 2,67	± 3,56	± 4,49	± 5,27
<b>Gruppe T2</b>	$\bar{x}$	9,10	10,23	12,45	15,46	18,59	23,55	27,71
	$\sigma$	± 0,95	± 1,03	± 1,55	± 2,21	± 3,13	± 4,06	± 5,04
<b>Gruppe T3</b>	$\bar{x}$	9,07	10,13	12,33	14,77	17,56	22,95	27,15
	$\sigma$	± 0,98	± 1,11	± 1,58	± 2,27	± 2,94	± 3,81	± 4,4
<b>Gruppe T4</b>	$\bar{x}$	9,09	10,12	12,35	14,82	17,23	21,85	26,03
	$\sigma$	± 1,00	± 1,00	± 1,50	± 1,79	± 2,12	± 2,47	± 2,82
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1								

Tabelle 4.3: Durchschnittliche Gesamtzunahmen im Versuchszeitraum (Tag 0-42), durchschnittliche tägliche Zunahmen und Futterverwertung (MW $\pm$ SD) pro Tier in den Versuchsgruppen

	Zunahmen gesamt kg		Zunahmen täglich g		Futterverwertung = FVZ / LMZ kg/kg	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	17,33	$\pm 4,73$	413	$\pm 113$	1,70	$\pm 0,42$
<b>Gruppe T2</b>	18,61	$\pm 4,25$	443	$\pm 101$	1,69	$\pm 0,43$
<b>Gruppe T3</b>	18,07	$\pm 3,67$	430	$\pm 87$	1,56	$\pm 0,32$
<b>Gruppe T4</b>	16,93	$\pm 2,42$	403	$\pm 55$	1,63	$\pm 0,25$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

$$FVW = \frac{FA}{LMZ}$$

Dabei wiesen alle Gruppen einen ähnlichen Bereich auf: pro kg Lebendmassezunahme wurde bei allen Fütterungsrationen durchschnittlich 1,56 bis 1,70 kg Futter benötigt.

### 4.3 Patho-histologische Parameter

Am Versuchsende wurde den Tieren am Institut für Tierpathologie, Tierklinisches Department der LMU München, zur Erfassung der Gewichte die Organe Herz, Lunge, Leber, Milz, rechte und linke Niere entnommen.

Auch hier zeigten sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen T2, T3, T4 und der Kontrollgruppe T1.

Tabelle 4.4: Masse der Organe Herz, Lunge und Leber (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Herz</b> g		<b>Lunge</b> g		<b>Leber</b> g	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	153,44	$\pm 14,93$	450,28	$\pm 98,84$	1129,03	$\pm 143,33$
<b>Gruppe T2</b>	159,32	$\pm 19,53$	499,93	$\pm 103,19$	1107,75	$\pm 209,35$
<b>Gruppe T3</b>	158,45	$\pm 22,76$	475,50	$\pm 101,03$	1140,62	$\pm 130,43$
<b>Gruppe T4</b>	145,90	$\pm 13,11$	448,18	$\pm 107,06$	1117,27	$\pm 76,17$
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1						

### 4.3.1 Organmassen

Das vorzeitig verstorbene Tier 45 wurde auf Grund der geringeren Organgewichte nicht in die Berechnungen einbezogen.

Dadurch ergibt sich folgende Probenanzahl:

**Kontrolle T1**  $n=12$

**Gruppe T2**  $n=12$

**Gruppe T3**  $n=11$

**Gruppe T4**  $n=12$

### Masse der Organe Herz, Lunge und Leber

Statistisch ergab sich für die Masse der Organe Herz, Lunge und Leber der drei Versuchsgruppen T2, T3 und T4 keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe T1.

Die ermittelten Gewichte gehen aus Tabelle 4.4 hervor.

Die Tiere der Gruppe T2 besaßen sowohl die höchsten Herz-, als auch Lungenmassen.

Im Falle der Masse der Leber wiesen die Tiere der Gruppe T3 die höchste Durchschnittsmasse auf.

Tabelle 4.5: Masse der Organe Milz, rechte und linke Niere (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Milz</b>		<b>Niere rechts</b>		<b>Niere links</b>	
	g		g		g	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	76,21	$\pm 28,18$	91,96	$\pm 15,67$	96,68	$\pm 18,22$
<b>Gruppe T2</b>	72,23	$\pm 33,21$	92,97	$\pm 20,04$	95,43	$\pm 19,59$
<b>Gruppe T3</b>	72,27	$\pm 21,30$	88,46	$\pm 19,27$	87,90	$\pm 27,13$
<b>Gruppe T4</b>	75,72	$\pm 25,90$	91,62	$\pm 10,32$	95,33	$\pm 13,59$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

### Masse der Organe Milz, rechte und linke Niere

Die Tiere der Gruppe T1 besaßen sowohl für die Milz, als auch für die Durchschnittsmasse aus beiden Nieren, die höchste Organmasse. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen waren gering, und es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied für die Masse der Organe Milz, rechte und linke Niere zwischen den Versuchsgruppen (T2, T3, T4) und der Kontrollgruppe T1. Die ermittelten Organmassen gehen aus Tabelle 4.5 hervor.

### 4.3.2 Makroskopische und histologische Parameter

Bei allen Gruppen waren sowohl makroskopisch, als auch histologisch keine Anzeichen metastatischer Verkalkungen zu finden.

#### Makroskopische Parameter

Eine makroskopische Untersuchung wurde von allen Tieren durchgeführt.

Die Tiere waren in einem guten Ernährungszustand. Neben Organveränderungen, die auf eine Euthanasie hindeuten (akute Stauungshyperämie der Lungen, lokale Ödeme und Emphyseme der Lunge, Dilatation der Herzventrikel, Hyperämie in Milz, Niere, Leber und Thymus), waren an manchen Tieren Cyanosen der Ohren und des ventralen Abdomens zu erkennen, die auf den Transport in das Institut für Tierpathologie nach der Euthanasie zurückzuführen sind.

Tabelle 4.6: Makroskopische Befunde aller Tiergruppen

	katarrhalische Enteritis	Hyperplasie peripherer Lymphknoten	Hyperplasie mesenterialer Lymphknoten	Magen: Hyperkeratose Pars proventricularis
<b>Kontrolle T1</b>	3	1	1	1
<b>Gruppe T2</b>	2	1	10	5
<b>Gruppe T3</b>	2	1	2	4
<b>Gruppe T4</b>	3	keines	10	4

Tabelle 4.7: Makroskopische Befunde aller Tiergruppen

Zusätzlich auffallende Befunde und die jeweils betroffenen Tierzahlen sind Tabelle 4.7 zu entnehmen.

Zur genaueren Abklärung wurde eine mikrobiologische Untersuchung mancher Tierproben eingeleitet, mit folgenden Ergebnissen:

- Ein Tier der Gruppe T1: E. coli + / Enterokokken ++ / Coronaviren positiv
- Ein Tier der Gruppe T2: E. coli + / Coronaviren positiv
- Ein Tier der Gruppe T4: Mikrobiologische Untersuchung unspezifisch / Coronaviren positiv

#### **Makroskopische und histologische Untersuchung der Gruppen T2 und T4**

Um die Verträglichkeit von 25(OH)D<sub>3</sub> auch auf organischer Ebene zu beurteilen, wurden Organproben der T2- und T4-Tiere auch histologisch untersucht. Hier wurde vor allem Wert auf mögliche Verkalkungen in den Geweben gelegt, die die primäre Folge einer Überdosierung mit 25(OH)D<sub>3</sub> darstellen. Die Resultate und Angaben der erkrankten Tierzahlen werden aus Tabelle 4.8 ersichtlich. Auch hier wurden keinerlei Anzeichen einer metastatischen Verkalkung gefunden.

Tabelle 4.8: Makroskopische und histologische Befunde der Tiergruppen T2 und T4

	Anzeichen Brachyspiren (Dysenterie)	Nierenzyste rechts	Verdacht Balantidium	generalisierte Hyperplasie der Lymphknoten
<b>Gruppe T2</b>	6	1	keines	keines
<b>Gruppe T4</b>	6	keines	1	1

## 4.4 Parameter der Blutuntersuchung

Allen Tieren wurde am Vortag der Euthanasie Blut entnommen.

Dies war von Tier 45 aus Gruppe T3 nicht mehr möglich, da es während des Versuches gestorben ist. Somit ergibt sich folgende Probenanzahl:

**Kontrolle T1** n=12

**Gruppe T2** n=12

**Gruppe T3** n=11

**Gruppe T4** n=12

### 4.4.1 Hämatologie

Die hämatologische Laboruntersuchung wurde noch am Tag der Blutentnahme von Mitarbeitern der Klinik für Schweine, Tierklinisches Department der LMU München, durchgeführt und dabei die Zahl der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, der Hämoglobingehalt, der Hämatokritwert, ein Differentialblutbild sowie die Werte MCH, MCV und MCHC bestimmt. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Referenzwerte sind dem Standardwerk KRAFT et al. (2005) entnommen.

Tabelle 4.9: Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Erythrozyten</b> x10 <sup>3</sup> /μl		<b>Leukozyten</b> x10 <sup>3</sup> /μl		<b>Thrombozyten</b> x10 <sup>3</sup> /μl	
Referenzbereich	5,8-8,1		10-22,0		220-620	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	6,65	$\pm 0,48$	16,63	$\pm 3,54$	468,17	$\pm 76,07$
<b>Gruppe T2</b>	6,73	$\pm 0,41$	16,99	$\pm 3,29$	507,50	$\pm 66,12$
<b>Gruppe T3</b>	6,64	$\pm 0,49$	15,67	$\pm 2,34$	465,55	$\pm 133,28$
<b>Gruppe T4</b>	6,45	$\pm 0,47$	15,41	$\pm 1,20$	444,67	$\pm 112,59$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

### Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl

In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der Blutuntersuchung wiedergegeben, welche alle im Referenzbereich lagen. Die Tiere der Gruppe T2 zeigten die höchsten Werte der Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, wobei die Differenz zu den anderen Gruppen nicht sehr hoch ausfiel und zudem nicht statistisch signifikant war.

### Hämoglobingehalt und Hämatokritwert

Der Hämoglobingehalt war in allen Gruppen geringfügig unter dem angegebenen Referenzwert von 10,8 g/dl.

Den unteren Referenzwert des Hämatokritgehaltes von 33% erreichten die Tiere aller Gruppen außer denen der Gruppe T4, welche mit einem Durchschnittswert von 32,78 geringfügig darunter lagen.

Die genauen Ergebnisse gehen aus Tabelle 4.10 hervor.

### Mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), Mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH) und Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC)

MCV (Mean Corpuscular Volume = mittleres Volumen eines Ery), MCH (Mean Corpuscular Hb = mittlere Hb-Masse/Ery) und MCHC (Mean Corpuscular Hb-Concentration = mittlere

Tabelle 4.10: Hämoglobingehalt und Hämatokritwert (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

Referenzbereich	Hämoglobin g/dl		Hämatokrit %	
	10,8-14,8		33-45	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	10,21	$\pm 0,59$	33,44	$\pm 1,72$
<b>Gruppe T2</b>	10,34	$\pm 0,63$	33,48	$\pm 1,96$
<b>Gruppe T3</b>	10,36	$\pm 0,55$	33,84	$\pm 2,01$
<b>Gruppe T4</b>	9,97	$\pm 0,79$	32,78	$\pm 2,63$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

Hämoglobin-Konzentration in den Erys) sind errechnete Werte aus den oben festgestellten Parametern. Da der Hämoglobingehalt aller Gruppen (s. Tabelle 4.10) etwas zu niedrig war, fiel als Folge auch der MCH-Wert zu gering aus, da es sich um einen errechneten Parameter handelt.

Relativ gleichmäßige Werte für die Gruppen T1-T4 lagen für die Parameter MCH und MCHC vor. Dagegen lagen die Tiere der Gruppe T2 für den MCHC, im Gegensatz zu den anderen Tieren, etwas unter dem angegebenen Referenzbereich, wobei auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand.

### Differentialblutbild

Die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Leukozyten ergänzte das vorangegangene kleine Blutbild. Alle Werte der untersuchten Parameter lagen für die jeweiligen Gruppen im angegebenen Referenzbereich und zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen T2-T4 und der Kontrollgruppe T1.

Die Ergebnisse des Differentialblutbildes sind in den Tabellen 4.12 und 4.13 zusammenfassend wiedergegeben.



Tabelle 4.11: MCV-, MCH- und MCHC-Werte (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

Referenzbereich	<b>MCV</b> fl 50-65		<b>MCH</b> pg 17-21		<b>MCHC</b> g/dl 30-35	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	50,25	$\pm 1,66$	15,37	$\pm 0,75$	30,52	$\pm 0,67$
<b>Gruppe T2</b>	49,83	$\pm 1,64$	15,36	$\pm 0,58$	30,89	$\pm 0,49$
<b>Gruppe T3</b>	51,00	$\pm 2,32$	15,64	$\pm 0,96$	30,62	$\pm 0,81$
<b>Gruppe T4</b>	50,83	$\pm 1,59$	15,46	$\pm 0,60$	30,40	$\pm 0,52$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

Tabelle 4.12: Lymphozyten, Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	<b>Lymphozyten</b> %		<b>Monozyten</b> %		<b>basophile Granulozyten</b> %		<b>eosinophile Granulozyten</b> %	
	49-85		0-5		0-2		0-6	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	54,08	$\pm 6,61$	2,67	$\pm 0,89$	0,17	$\pm 0,39$	0,83	$\pm 0,83$
<b>Gruppe T2</b>	51,92	$\pm 10,25$	2,42	$\pm 1,08$	0,33	$\pm 0,65$	1,67	$\pm 1,50$
<b>Gruppe T3</b>	56,27	$\pm 6,12$	2,73	$\pm 1,10$	0,09	$\pm 0,30$	1,45	$\pm 0,82$
<b>Gruppe T4</b>	56,67	$\pm 8,06$	2,58	$\pm 2,11$	0,08	$\pm 0,29$	1,17	$\pm 1,03$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1								

Tabelle 4.13: Metamyelozyten, stabkernige neutrophile Granulozyten und segmentkernige neutrophile Granulozyten (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	Metamyelozyten		Stabkernige Neutrophile		Segmentkernige Neutrophile	
	%		%		%	
	nicht bekannt		0-7		10-39	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	0,83	$\pm 1,40$	4,75	$\pm 2,18$	36,50	$\pm 6,70$
<b>Gruppe T2</b>	1,33	$\pm 1,37$	5,92	$\pm 3,68$	36,42	$\pm 8,03$
<b>Gruppe T3</b>	0,45	$\pm 1,04$	4,36	$\pm 3,53$	34,27	$\pm 6,18$
<b>Gruppe T4</b>	1,17	$\pm 2,25$	4,92	$\pm 2,47$	33,42	$\pm 8,58$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

#### 4.4.2 Klinisch-chemische Parameter

In den Serumproben wurden verschiedene Enzyme (AST, GGT, GLDH, AP, BAP), Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß und Albumin, sowie mehrere Mineralstoffe (Natrium, Kalium, Chlorid, Phosphor, Gesamtcalcium) und 25-Hydroxycholecalciferol bestimmt. Die ermittelten Werte ergaben lediglich für das 25-Hydroxycholecalciferol statistisch signifikante Unterschiede.

Die angegebenen Referenzwerte gelten für Schweine der Deutschen Landrasse im Alter von 10-12 Wochen nach HEINRITZI (2006c).

##### 4.4.2.1 Enzyme

##### Aspartat-Amino-Transferase (AST), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und Glutamat-Dehydrogenase GLDH)

Sowohl die Enzymaktivität der AST, als auch der GGT lagen bei allen Tieren über den angegebenen Referenzwerten. Der Normbereich der AST liegt bei 6,8 bis 30,4 U/l, wobei die Werte in allen Gruppen auf einen Bereich von 38,31 bis 40,53 U/l angestiegen waren. Der

Tabelle 4.14: Aspartat-Amino-Transferase (AST), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	<b>AST</b> U/l 6,8-30,4		<b>GGT</b> U/l 0-29,2		<b>GLDH</b> U/l 0-1,2	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	38,31	$\pm 7,19$	42,67	$\pm 15,62$	0,81	$\pm 0,35$
<b>Gruppe T2</b>	39,19	$\pm 6,57$	43,76	$\pm 10,62$	0,61	$\pm 0,31$
<b>Gruppe T3</b>	39,57	$\pm 13,46$	42,64	$\pm 17,00$	0,81	$\pm 0,23$
<b>Gruppe T4</b>	40,53	$\pm 6,06$	43,38	$\pm 10,06$	0,84	$\pm 0,25$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

Referenzbereich der GGT befindet sich zwischen 0 und 29,2 U/l und war hier auf Werte von 42,64 bis 43,76 U/l erhöht.

Die Aktivität der GLDH war bei den Tieren der Gruppe T2 am Geringsten. Jedoch konnte weder hier noch bei den anderen Ergebnissen ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

#### **Alkalische Phosphatase (AP) und knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)**

Die Tiere der Gruppe T2 wiesen sowohl für die AP, als auch für die BAP, eine höhere Enzymaktivität im Vergleich zu den anderen Tiergruppen auf. Die AP-Werte bewegten sich für alle Tiergruppen im angegebenen Referenzbereich. Weder für die AP-, noch für die BAP-Ergebnisse ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede.

Tabelle 4.15 gibt einen Überblick über die dargestellten Ergebnisse der AP- und BAP-Aktivität.

Tabelle 4.15: Alkalische Phosphatase (AP) und knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	<b>AP</b> U/l 130-494		<b>BAP</b> U/l nicht bekannt	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	189,81	$\pm 64,33$	92,25	$\pm 28,68$
<b>Gruppe T2</b>	224,88	$\pm 43,30$	114,97	$\pm 23,65$
<b>Gruppe T3</b>	197,90	$\pm 47,30$	103,47	$\pm 17,78$
<b>Gruppe T4</b>	208,49	$\pm 53,01$	102,53	$\pm 24,62$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

#### 4.4.2.2 Glucose, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß und Albumin

##### Glucose, Harnstoff und Kreatinin

Alle Ergebnisse der drei untersuchten Parameter lagen im angegebenen Referenzbereich und wiesen statistisch keine signifikanten Unterschiede auf. Die Glucose-, Harnstoff- und Kreatininresultate waren in allen Gruppen sehr ähnlich und reichten von 5,54 bis 5,86 mmol/l für die Glucosewerte, 2,34 bis 2,68 mmol/l für die Harnstoffwerte und 65,39 bis 71,75  $\mu$ mol/l für die Kreatininwerte.

In Tabelle 4.16 sind die genauen Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst.

##### Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß und Albumin

Für alle drei Parameter lagen in den einzelnen Gruppen nur geringe, nicht statistisch signifikante Unterschiede vor. Zudem waren alle Ergebnisse im angegebenen Referenzbereich.

Tabelle 4.17 gibt die genauen Werte der Untersuchung wieder.

Tabelle 4.16: Glucose, Harnstoff und Kreatinin (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	<b>Glucose</b> mmol/l		<b>Harnstoff</b> mmol/l		<b>Kreatinin</b> $\mu$ mol/l	
	3,7-7,3		1,8-5,5		40-100	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	5,54	$\pm 0,97$	2,68	$\pm 0,59$	71,75	$\pm 10,55$
<b>Gruppe T2</b>	5,72	$\pm 0,48$	2,68	$\pm 0,44$	69,00	$\pm 7,74$
<b>Gruppe T3</b>	5,86	$\pm 1,16$	2,46	$\pm 0,57$	65,39	$\pm 15,09$
<b>Gruppe T4</b>	5,56	$\pm 0,69$	2,34	$\pm 0,86$	65,59	$\pm 9,47$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

Tabelle 4.17: Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß und Albumin (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	<b>Gesamtbilirubin</b> $\mu$ mol/l		<b>Gesamteiweiß</b> g/l		<b>Albumin</b> g/l	
	0-2,2		49,6-72,4		26,6-38,6	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	0,42	$\pm 0,38$	55,43	$\pm 5,46$	33,20	$\pm 3,47$
<b>Gruppe T2</b>	0,29	$\pm 0,25$	55,22	$\pm 7,25$	34,24	$\pm 6,10$
<b>Gruppe T3</b>	0,22	$\pm 0,22$	56,86	$\pm 5,84$	34,44	$\pm 4,90$
<b>Gruppe T4</b>	0,37	$\pm 0,62$	54,61	$\pm 4,20$	32,13	$\pm 3,09$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

Tabelle 4.18: Natrium, Kalium und Chlorid (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	Natrium mmol/l 137-149		Kalium mmol/l 4,4-6,9		Chlorid mmol/l 100-111	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	135,44	$\pm 13,56$	6,57	$\pm 3,89$	93,50	$\pm 9,80$
<b>Gruppe T2</b>	139,24	$\pm 7,83$	5,17	$\pm 0,36$	96,47	$\pm 4,93$
<b>Gruppe T3</b>	135,78	$\pm 16,30$	5,35	$\pm 1,20$	93,93	$\pm 11,04$
<b>Gruppe T4</b>	140,38	$\pm 5,69$	5,31	$\pm 0,59$	97,11	$\pm 3,30$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1						

#### 4.4.2.3 Mineralstoffe

##### Natrium, Kalium und Chlorid

Mit 135,44 *mmol/l* Natrium (Gruppe T1) und 135,78 *mmol/l* Natrium (Gruppe T3) im Serum lagen diese Durchschnittswerte geringgradig unter dem angegebenen Referenzbereich von 137-149 *mmol/l*. Die niedrigeren Resultate für die Gruppen T1 und T3 wiesen statistisch keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Gruppen T2 und T4 auf.

Die durchschnittlichen Kaliumwerte der Gruppe T1 lagen etwas über den Werten der anderen Gruppen, allerdings ohne einen statistisch signifikanten Unterschied. Der Kaliumgehalt der Tiere aller vier Gruppen war im angegebenen Referenzbereich.

Die mittleren Chloridgehalte der einzelnen Gruppen lagen mit Werten von 93,50 bis 97,11 *mmol/l* etwas unterhalb der Norm von 100 bis 111 *mmol/l* Serum. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe T1 und den Gruppen T2, T3 und T4 festgestellt.

Die Ergebnisse der Natrium-, Kalium- und Chloridanalyse sind in Tabelle 4.18 aufgeführt.

##### Phosphor und Gesamtcalcium

Der Phosphorgehalt im Serum lag bei allen Tieren mit ähnlichen Werten von 3,75 bis 3,97 *mmol/l* etwas über dem angegebenen Referenzbereich von 2,5 bis 3,4 *mmol/l*.

Tabelle 4.19: Phosphor und Gesamtcalcium (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen

Referenzbereich	Phosphor mmol/l		Gesamtcalcium mmol/l	
	2,5-3,4		2,5-3,3	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	3,78	$\pm 0,50$	2,39	$\pm 0,80$
<b>Gruppe T2</b>	3,81	$\pm 0,35$	2,66	$\pm 0,24$
<b>Gruppe T3</b>	3,75	$\pm 0,56$	2,64	$\pm 0,34$
<b>Gruppe T4</b>	3,97	$\pm 0,31$	2,67	$\pm 0,13$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

Die durchschnittlichen Gesamtcalciumwerte waren für die Gruppen T2, T3 und T4 mit sehr ähnlichen Werten innerhalb des Referenzbereichs, während der mittlere Gesamtcalciumgehalt der Gruppe T1 geringfügig darunter lag.

Für beide Parameter wurden statistisch keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

Die Ergebnisse der Phosphor- und Gesamtcalciumgehalte sind in Tabelle 4.19 zusammengefasst.

#### 4.4.2.4 25-Hydroxycholecalciferol

Die Ermittlung des 25-Hydroxycholecalciferolgehaltes im Plasma wurde in den Laboratorien von DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) durchgeführt.

Der 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalt nahm von Gruppe T1 bis Gruppe T4 deutlich zu. Dabei ergaben die Gehalte im Plasma der Gruppe T3 mit 13,7-fach und die Gruppe T4 mit 21,8-fach höheren Werten statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05) gegenüber der Kontrollgruppe T1.

Tabelle 4.20 führt die mittleren 25-Hydroxycholecalciferolgehalte im Plasma der Tiergruppen auf.

Tabelle 4.20: 25-Hydroxycholecalciferolgehalt im Plasma ( $MW \pm SD$ ) der Versuchsgruppen

	25(OH)D <sub>3</sub> ng/ml		
	$\bar{x}$	$\sigma$	
<b>Kontrolle T1</b>	16,50	$\pm 3,29$	
<b>Gruppe T2</b>	64,10	$\pm 7,30$	
<b>Gruppe T3</b>	226,70	$\pm 29,81$	*
<b>Gruppe T4</b>	360,00	$\pm 49,55$	*
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1			

## 4.5 Knochenparameter

Der am Institut für Tierpathologie, Tierklinisches Department der LMU München, entnommene linke Femur wurde später weiter untersucht.

Das vorzeitig verstorbene Tier 45 wurde nicht in die Berechnungen mit einbezogen, woraus folgende Probenzahl resultiert:

**Kontrolle T1**  $n=12$

**Gruppe T2**  $n=12$

**Gruppe T3**  $n=11$

**Gruppe T4**  $n=12$

### 4.5.1 Knochenlänge

Die Länge der Femurknochen wurde vom proximalen Caput femoris diagonal zum distalen Ende des Condylus lateralis ossis femoris gemessen. Zunächst erfolgte ein Vergleich der absoluten Längen, wobei mit einer durchschnittlichen Länge von  $137,67 \text{ mm} \pm 0,80$  nur geringgradige



Tabelle 4.21: Absolute Länge der Knochen und relative Länge der Knochen bezogen auf 10 kg Körpermasse (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	Absolute Länge mm		Relative Länge mm/10 kg KM	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	137,53	$\pm 5,18$	53,71	$\pm 9,31$
<b>Gruppe T2</b>	138,38	$\pm 4,07$	51,42	$\pm 9,05$
<b>Gruppe T3</b>	138,16	$\pm 3,71$	52,09	$\pm 8,28$
<b>Gruppe T4</b>	136,59	$\pm 5,90$	53,05	$\pm 6,05$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten.

Desweiteren wurde die Länge der Knochen in Relation zur Körpermasse der Tiere gesetzt. Hierbei ergaben sich geringe Unterschiede, die statistisch keine Signifikanz aufwiesen. So waren die Knochen der Kontrollgruppe T1 mit durchschnittlich 53,71 mm/10kg KG  $\pm 9,31$  die längsten Knochen im Vergleich zu den kürzesten Knochen der Gruppe T2 mit im Mittel 51,42 mm/10kg KG  $\pm 6,05$ .

Tabelle 4.21 enthält die absoluten und relativen Knochenlängen der Versuchsgruppen.

#### 4.5.2 Knochendurchmesser

Der Knochendurchmesser wurde laterolateral mittig am Schaft zwischen Trochanter minor und den beiden Condylen gemessen. Wie schon bei der Knochenlänge wurde zunächst der absolute Durchmesser verglichen und daraufhin der ins Verhältnis zur Körpermasse der Tiere gesetzte Durchmesser der Knochen.

Wie schon bei der Knochenlänge wiesen die absoluten Durchmesser der Femurknochen mit durchschnittlich 16,66 mm  $\pm 0,15$  nur geringgradige Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Auch vergleichbar der Knochenlänge besaßen die Knochen der Kontrollgruppe T1 mit 6,56

Tabelle 4.22: Absoluter Durchmesser der Knochen und relativer Durchmesser der Knochen bezogen auf 10 kg Körpermasse (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	Absoluter Durchmesser mm		Relativer Durchmesser mm/10 kg KM	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	16,83	$\pm 0,70$	6,56	$\pm 1,06$
<b>Gruppe T2</b>	16,73	$\pm 0,97$	6,19	$\pm 0,96$
<b>Gruppe T3</b>	16,52	$\pm 0,74$	6,22	$\pm 0,99$
<b>Gruppe T4</b>	16,54	$\pm 0,55$	6,43	$\pm 0,78$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

mm/10kg KG  $\pm 1,06$  den größten relativen Durchmesser. Dagegen wiesen die Knochen der Gruppe T2 mit 6,19 mm/10kg KG  $\pm 0,96$  den geringsten Durchmesser der Tiere auf, wobei zwischen den Versuchsgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied bestand.

In Tabelle 4.22 sind die Werte der absoluten und relativen Knochendurchmesser aufgeführt.

### 4.5.3 Knochenmasse

Gleich der Knochenlänge und dem Knochendurchmesser wurden auch bei der Knochenmasse zunächst die absoluten Werte verglichen, und daraufhin die ins Verhältnis zur Körpermasse der Tiere gesetzte Masse der Knochen. Wie schon bei der Knochenlänge und dem Knochendurchmesser unterschieden sich die absoluten Massen mit durchschnittlich 112,86 g  $\pm 0,69$  nur gering voneinander.

Die durchschnittliche relative Knochenmasse der Gruppe T1 war mit 43,62 g/10kg KG  $\pm 5,54$  die höchste und die der Gruppe T2 mit 41,54 g/10kg KG  $\pm 4,19$  die geringste Knochenmasse der Versuchsgruppen, ähnlich der Knochenlänge und dem Knochendurchmesser, wobei der Vergleich der absoluten und relativen Knochenmassen keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwies.

Die genauen Werte der absoluten und relativen Knochenmasse sind Tabelle 4.23 zu entnehmen.

Tabelle 4.23: Absolute Masse der Knochen und relativer Durchmesser der Knochen bezogen auf 10 kg Körpermasse (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	Absolute Masse		Relative Masse	
	g		g/10 kg KM	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	113,17	$\pm 13,88$	43,62	$\pm 5,54$
<b>Gruppe T2</b>	113,33	$\pm 12,03$	41,54	$\pm 4,19$
<b>Gruppe T3</b>	113,09	$\pm 9,7$	42,41	$\pm 6,16$
<b>Gruppe T4</b>	111,83	$\pm 11,82$	43,29	$\pm 5,24$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

#### 4.5.4 Bruchlast und Dehnung

Die für das Brechen des Femurs benötigte Kraft  $F_{max}$ , wies bei den Gruppen T1 und T2, die sich nur gering voneinander unterschieden, mit durchschnittlich  $1642,53 \text{ N} \pm 2,53$  die niedrigsten Werte auf. Mit steigendem 25-Hydroxycholecalciferolgehalt im Futter nahm auch die benötigte Bruchlast zu, allerdings ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ergeben.

Die Dehnungsfähigkeit der Knochen stieg mit zunehmendem 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalt im Futter. Dabei lagen die Werte der konventionell mit Vitamin D<sub>3</sub> gefütterten Tiere (T1) zwischen der Dehnung der Knochen der Gruppen T2 und T3. Trotz der sichtbaren Steigerung waren keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen.

Die Ergebnisse der Bruchlast- und Dehnungsuntersuchung sind in Tabelle 4.24 zusammengefasst.

#### 4.5.5 Knochenaschegehalt

Der Knochenaschegehalt der Versuchsgruppen wurde sowohl auf die ursprüngliche Substanz, als auch auf die nicht fettfreie Trockensubstanz der Knochen bezogen. Weder in Bezug auf die ursprüngliche Substanz, noch auf die Trockensubstanz, waren statistisch signifikante Un-

Tabelle 4.24: Bruchlast  $F_{max}$  und Dehnung  $\epsilon-F_{max}$  der Knochen (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	Bruchlast $F_{max}$		Dehnung $\epsilon - F_{max}$	
	N		mm	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	1640,74	$\pm 291,13$	6,21	$\pm 0,93$
<b>Gruppe T2</b>	1644,32	$\pm 419,34$	6,04	$\pm 0,79$
<b>Gruppe T3</b>	1734,26	$\pm 245,91$	6,36	$\pm 0,51$
<b>Gruppe T4</b>	1765,78	$\pm 197,92$	6,61	$\pm 0,79$
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1				

terschiede festzustellen.

Nur die Gruppe T4 wies geringgradig höhere Werte im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen auf.

Tabelle 4.25 gibt den Aschegehalt in Prozent der ursprünglichen Substanz und in Prozent der nicht fettfreien Trockensubstanz wieder.

### Knochencalciumgehalt und -phosphorgehalt

Beim Knochencalciumgehalt waren keine großen Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Lediglich die Gruppe T2 wies geringgradig höhere Werte als die anderen Versuchsgruppen auf, allerdings ohne statistisch signifikante Unterschiede.

Der Vergleich des Phosphorgehalts der Femora ergab einen geringfügig niedrigeren Wert für die Gruppe T2. Im Mittel unterschieden sich die Versuchsgruppen nur wenig und statistisch nicht signifikant voneinander.

Tabelle 4.26 führt die mittleren Calcium- und Phosphorgehalte der Femora auf.

Tabelle 4.25: Aschegehalt der Knochen bezogen auf US und nicht fettfreie TS (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Asche % US</b>		<b>Asche % TS</b>	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	18,09	$\pm 1,10$	41,80	$\pm 1,83$
<b>Gruppe T2</b>	18,16	$\pm 1,67$	41,66	$\pm 2,44$
<b>Gruppe T3</b>	18,03	$\pm 1,11$	41,80	$\pm 1,89$
<b>Gruppe T4</b>	18,92	$\pm 0,52$	43,24	$\pm 1,36$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

Tabelle 4.26: Calcium- und Phosphorgehalt der Knochen (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Calcium mg/g Asche</b>		<b>Phosphor mg/g Asche</b>	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	347,67	$\pm 5,88$	172,68	$\pm 3,51$
<b>Gruppe T2</b>	352,25	$\pm 6,03$	171,40	$\pm 3,88$
<b>Gruppe T3</b>	346,94	$\pm 4,08$	174,86	$\pm 3,21$
<b>Gruppe T4</b>	345,35	$\pm 6,62$	174,24	$\pm 6,13$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

## 4.6 Organparameter

### 4.6.1 25-Hydroxycholecalciferol

Der Nachweis von 25-Hydroxycholecalciferol in den Organen erfolgte durch die Laboratorien der DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel).

Die Ergebnisse mancher Gruppen, vornehmlich der Kontrollgruppe T1, lagen unter der Nachweisgrenze (LLQ). Um die gemessenen Werte der anderen Gruppen trotzdem statistisch auswerten zu können, wurde hypothetisch der gerade nicht mehr messbare Wert (auch nicht aufgerundet) als höchstmögliches Ergebnis herangezogen.

Folgende Nachweisgrenzen wurden für das 25-Hydroxycholecalciferol-Untersuchungsverfahren ermittelt:

**Muskel** 5 *ng/g*

**Leber und Niere** 10 *ng/g*

**Haut und Fett** 20 *ng/g*.

Somit ergeben sich folgende hypothetische LLQ-Werte als höchste anzunehmende Messwerte:

**Muskel** 4,44 *ng/g*

**Leber und Niere** 9,44 *ng/g*

**Haut und Fett** 19,44 *ng/g*.

#### 4.6.1.1 Fett- und Hautgewebe

Beim Fettgewebe konnte weder für die Kontrollgruppe T1, noch für die Gruppe T2 ein 25-Hydroxycholecalciferolwert ermittelt werden, da dieser unter der Nachweisgrenze von 20 *ng/g* lag. Mit dem dafür eingesetzten Wert von 19,44 *ng/g* unterschieden sich die höher dosierten Gruppen mit Werten von 35,78 *ng/g*  $\pm$  8,73 der Gruppe T3, und 52,76 *ng/g*  $\pm$  9,35 der Gruppe T4 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrollgruppe T1.

Auch beim 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Haut konnten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) ermittelt werden. Während sich die Gruppe T2 im Verhältnis nur gering von

Tabelle 4.27: 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Fett- und Hautgewebe (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen, max. angenommener Wert 19,44 *ng/g* für T1 und T2 (LLQ<sub>Fett,Haut</sub> 20 *ng/g*)

	25(OH)D <sub>3</sub> Fett ng/g US			25(OH)D <sub>3</sub> Haut ng/g US		
	$\bar{x}$	$\sigma$		$\bar{x}$	$\sigma$	
<b>Kontrolle T1</b>	LLQ			21,29	$\pm 3,81$	
<b>Gruppe T2</b>	LLQ			27,84	$\pm 9,55$	
<b>Gruppe T3</b>	35,78	$\pm 8,73$	*	97,27	$\pm 34,39$	*
<b>Gruppe T4</b>	52,76	$\pm 9,35$	*	158,50	$\pm 59,17$	*
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1						

der Kontrolle T1 unterschied, wiesen die Gruppen T3 und T4 einen um etwa 4,6-fach bzw. 7,5-fach höheren 25-Hydroxycholecalciferolgehalt auf. Um diese Werte erhalten zu können, musste für vereinzelte Tiere der Gruppe T1 und T2 der hypothetische LLQ-Wert von 19,44 *ng/g* angenommen werden.

In Tabelle 4.27 sind die 25-Hydroxycholecalciferolwerte des Fett- und Hautgewebes der Versuchsgruppen dargestellt.

#### 4.6.1.2 Muskel- und Lebergewebe

Die Nachweisgrenze des 25-Hydroxycholecalciferolgehaltes im Muskel beträgt 5 *ng/g*. Dieser Wert wurde für alle Tiere der Gruppe T1 und für vereinzelte Tiere der Gruppe T2 nicht erreicht, weshalb bei diesen Tieren von einem hypothetisch maximal anzunehmenden Wert von 4,44 *ng/g* ausgegangen wurde. Dadurch ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der Kontrollgruppen T1 zu den Gruppen T3 und T4. Die Gruppe T3 wies etwa das 4,4-fache und die Gruppe T4 etwa das 6,3-fache an 25(OH)D<sub>3</sub> im Muskel auf, als die Gruppe T1.

Für das Lebergewebe liegt die Nachweisgrenze bei 10 *ng/g*. Auch hier musste für die Gruppe T1 der hypothetisch maximal anzunehmende Wert, in diesem Falle 9,44 *ng/g*, eingesetzt werden, da bei diesen Tieren kein 25(OH)D<sub>3</sub>-Wert ermittelt werden konnte. Die 25(OH)D<sub>3</sub>-Werte

Tabelle 4.28: 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Muskel- und Lebergewebe ( $MW \pm SD$ ) in den Versuchsgruppen, max. angenommener Wert 4,44 bzw. 9,44  $ng/g$  für T1 und z.T. T2 ( $LLQ_{Muskel}$  5  $ng/g$ ;  $LLQ_{Leber}$  10  $ng/g$ )

	25(OH)D <sub>3</sub> Muskel ng/g US			25(OH)D <sub>3</sub> Leber ng/g US		
	$\bar{x}$	$\sigma$		$\bar{x}$	$\sigma$	
<b>Kontrolle T1</b>	LLQ			LLQ		
<b>Gruppe T2</b>	5,37	$\pm 1,17$		17,83	$\pm 3,96$	
<b>Gruppe T3</b>	19,55	$\pm 3,47$	*	48,22	$\pm 14,52$	*
<b>Gruppe T4</b>	27,86	$\pm 8,42$	*	81,64	$\pm 18,23$	*
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1						

der Gruppe T2 lagen zwar fast doppelt so hoch wie die angenommenen Werte der Gruppe T1, allerdings ohne sich statistisch signifikant zu unterscheiden.

In Gruppe T3 betrug die Differenz des höheren 25(OH)D<sub>3</sub>-Werts gegenüber Gruppe T1 das 5,1-fache und ergab somit einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ).

Die Gruppe T4 wies mit einem um das 8,7-fach höheren Wert ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Kontrollgruppe T1 auf.

In Tabelle 4.28 sind die 25-Hydroxycholecalciferolwerte des Muskel- und Lebergewebes aufgeführt.

#### 4.6.1.3 Nierengewebe

Auch bei der Nierenuntersuchung musste der hypothetisch maximal anzunehmende Wert von 9,44  $ng/g$  für die Gruppe T1 gesetzt werden, da alle Werte unter der Nachweisgrenze lagen. Die Tiere der Gruppe T2 wiesen einen etwa um das doppelte höheren 25(OH)D<sub>3</sub>-Wert im Vergleich zum hypothetischen T1-Wert auf, allerdings ohne statistisch signifikante Unterschiede. Die Gruppe T3 unterschied sich mit einem etwa 6,1-fach höheren 25(OH)D<sub>3</sub>-Wert statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Gruppe T1, die Gruppe 4 sogar mit etwa dem 9,0-fachen Wert im Vergleich zu T1.



Tabelle 4.29: 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Nierengewebe ( $MW \pm SD$ ) in den Versuchsgruppen, max. angenommener Wert 9,44 ng/g für T1 ( $LLQ_{Niere}$  10 ng/g)

25(OH)D <sub>3</sub> Niere ng/g US			
	$\bar{x}$	$\sigma$	
Kontrolle T1	LLQ		
Gruppe T2	17,25	±3,45	
Gruppe T3	57,75	±9,92	*
Gruppe T4	84,68	±11,80	*
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1			

In Tabelle 4.29 sind die genauen 25-Hydroxycholecalciferolgehalte des Nierengewebes angegeben.

#### 4.6.2 Nierenparameter

##### Trockensubstanz

Zwischen den Trockensubstanzwerten der verschiedenen Gruppen fielen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 4.30 aufgeführt.

##### Nierenaschegehalt

Der Nierenaschegehalt der Versuchsgruppen wurde sowohl auf die ursprüngliche Substanz, als auch auf die Trockensubstanz der Nieren bezogen.

Für beide Vergleiche ergaben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede.

Während die Tiere der Gruppe T4 den niedrigsten Aschegehalt in Bezug auf die ursprüngliche Substanz aufwiesen, wurde bei ihnen in Bezug auf die Trockensubstanz der höchste Aschegehalt festgestellt. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen fielen jedoch nur sehr gering aus.

Tabelle 4.30: Trockensubstanzgehalt der Nieren ( $MW \pm SD$ ) in den Versuchsgruppen

	Trockensubstanz % US	
	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	16,94	$\pm 1,17$
<b>Gruppe T2</b>	17,28	$\pm 1,06$
<b>Gruppe T3</b>	17,06	$\pm 0,74$
<b>Gruppe T4</b>	16,34	$\pm 1,33$
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1		

Die Ergebnisse des Vergleichs der Nierenaschegehalte sind in Tabelle 4.31 zusammengefasst.

### Calciumgehalt der Nieren

Beim Vergleich der Calciumgehalte der Nieren fielen mit Werten von durchschnittlich  $0,10 \text{ mg/g}$  US nur geringfügige und statistisch nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (siehe Tabelle 4.32).

## 4.7 Urinparameter

Nach Möglichkeit wurde die Urinentnahme mittels Cystocentese durchgeführt. Durch die Muskeler schlaffung nach dem Tode setzten allerdings manche Tiere unkontrolliert Urin ab, sodass dieser nur noch mit einem Becher aufgefangen werden konnte. Manche Tiere setzten auch auf Grund des Stresses schon vor der Euthanasie in der Box Urin ab, sodass von diesen Tieren kein Untersuchungsmaterial gewonnen werden konnte. Dadurch kommt eine Probenzahl von je 6 Tieren pro Gruppe zustande.

Tabelle 4.31: Aschegehalt der Nieren bezogen auf US und TS (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Asche % US</b>		<b>Asche % TS</b>	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	1,06	$\pm 0,03$	6,28	$\pm 0,36$
<b>Gruppe T2</b>	1,06	$\pm 0,03$	6,15	$\pm 0,32$
<b>Gruppe T3</b>	1,06	$\pm 0,04$	6,18	$\pm 0,31$
<b>Gruppe T4</b>	1,03	$\pm 0,03$	6,35	$\pm 0,45$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

Tabelle 4.32: Calciumgehalt der Nieren (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen

	<b>Calcium mg/g US</b>	
	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	0,09	$\pm 0,01$
<b>Gruppe T2</b>	0,10	$\pm 0,02$
<b>Gruppe T3</b>	0,10	$\pm 0,02$
<b>Gruppe T4</b>	0,10	$\pm 0,01$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1		

#### 4.7.1 Semiquantitative Parameter

Die Urinstick-Schnelluntersuchung ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Alle Tiere wiesen im Urin weder Glucose, noch Ketonkörper, noch Leukozyten auf.

Blut im Urin wurde bei insgesamt 3 Tieren, zwei Tiere der Gruppe T1 (+ und ++) und ein Tier der Gruppe T4 (+), festgestellt.

14 der 24 untersuchten Tiere enthielten Spuren (trace) von Protein im Urin.

Bilirubin und Urobilinogen war bis auf ein Tier in allen untersuchten Proben negativ. Dieses Tier der Gruppe T4 hatte sowohl Bilirubin (+) als auch Urobilinogen(2) im Urin.

Das spezifische Gewicht und der pH-Wert wurden an dieser Stelle zwar mit untersucht, allerdings später durch genauere Messmethoden abgesichert. Hier nur kurz die festgestellten, durchschnittlichen Ergebnisse der pH-Wert-Untersuchung der verschiedenen Gruppen: (T1)  $6,0 \pm 1,4$  ; (T2)  $6,3 \pm 1,3$  ; (T3)  $5,1 \pm 0,2$  und (T4)  $5,3 \pm 0,5$  . Der Vollständigkeit halber seien hier auch die durchschnittlichen spezifischen Gewichte der Versuchsgruppen aufgeführt: (T1)  $1019,2 \text{ N/m}^3 \pm 10,68$  ; (T2)  $1018,8 \text{ N/m}^3 \pm 10,59$  ; (T3)  $1023,3 \text{ N/m}^3 \pm 7,53$  und (T4)  $1021,3 \text{ N/m}^3 \pm 10,03$ .

#### 4.7.2 Makroskopische Parameter

Bei der makroskopischen Urinuntersuchung konnte zwischen den verschiedenen Gruppen kein Unterschied festgestellt werden. Der Urin hatte einen physiologischen Geruch, die Farbe war hellgelb bis dunkelgelb und die Transparenz bei den meisten Tieren klar. 6 Tiere aus verschiedenen Gruppen wiesen einen leicht getrübbten Harn auf, wobei dies bei den betroffenen Tieren auf die Art der Urinentnahme (bei all diesen wurde der Urin im Becher aufgefangen) zurückzuführen ist.

#### 4.7.3 pH-Wert

Der mittels pH-Meter ermittelte pH-Wert wies statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Der pH-Wert ist erheblich durch die Fütterung beeinflussbar und liegt bei Schweinen dadurch physiologisch zwischen 5,5 und 8,0 (KRAFT et al., 2005). Der durchschnittliche pH-Wert im Urin der Versuchstiere wies mit  $6,53 \pm 0,28$  einen leicht sauren Wert auf, der somit im Normbereich lag.

Tabelle 4.33: pH-Wert und spezifisches Gewicht ( $MW \pm SD$ ) im Urin in den Versuchsgruppen

	pH		spezifisches Gewicht N/m <sup>3</sup>	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	6,67	$\pm 1,26$	1020,83	$\pm 9,02$
<b>Gruppe T2</b>	6,85	$\pm 1,30$	1020,33	$\pm 6,19$
<b>Gruppe T3</b>	6,23	$\pm 0,94$	1021,50	$\pm 7,82$
<b>Gruppe T4</b>	6,37	$\pm 1,07$	1022,00	$\pm 8,72$
* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe T1				

In Tabelle 4.33 sind die durchschnittlichen pH-Werte der Versuchsgruppen angegeben.

#### 4.7.4 Spezifisches Gewicht

Auch bei der Urinuntersuchung mit Hilfe eines Handrefraktometers ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für das durchschnittliche, spezifische Gewicht zwischen den Versuchsgruppen.

Der Referenzbereich ist je nach Wasseraufnahme und -abgabe großen physiologischen Schwankungen unterworfen und reicht beim Schwein von 1001 bis 1040 N/m<sup>3</sup> (KRAFT et al., 2005). Somit lagen die untersuchten Harnproben mit einem spezifischen Gewicht von durchschnittlich 1021,17 N/m<sup>3</sup>  $\pm 0,73$  im Normbereich.

In Tabelle 4.33 sind die durchschnittlichen, spezifischen Gewichte der Versuchsgruppen angegeben.

#### 4.7.5 Mikroskopische Parameter

Zur mikroskopischen Urinuntersuchung (40er Objektiv) wurde ein Tropfen des zuvor hergestellten Harnsediments verwendet. Pro Tier wurden 20 Blickfelder ausgewertet und der daraus errechnete Durchschnitt bestimmt. Dabei konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede,

die auf die unterschiedlichen Zusatzstoffe oder Dosierungen zurückzuführen sind, festgestellt werden.

Trotz der Entnahme mittels Cystocentese waren in allen Proben unterschiedliche Mengen an Verunreinigungen und Bakterien zu finden. Desweiteren wiesen alle Gruppen unterschiedlich viele und unterschiedlich große Kristalle auf (Calciumoxalat-dihydrat- und Calciumoxalat-monohydrat-Kristalle). Im Durchschnitt lag die Kristallanzahl pro Blickfeld bei  $8,25 \pm 9,49$  (T1);  $6,33 \pm 4,55$  (T2);  $2,83 \pm 1,72$  (T3) und  $8,33 \pm 5,85$  (T4).

Darüber hinaus waren keine Besonderheiten festzustellen.

#### 4.7.6 Mineralstoffgehalt

Der Urincalcium- und Urinphosphorgehalt wurde als Quotient des Kreatiningehalts im Harn angegeben. Tabelle 4.34 stellt den Calcium-Kreatinin-Quotienten und den Phosphor-Kreatinin-Quotienten dar. Für beide Parameter ergaben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der Calcium-Kreatinin-Quotient der Gruppe T1 wies mit  $1,39 \pm 0,82$  den höchsten Wert auf, während die anderen 3 Gruppen mit einem durchschnittlichen Quotienten von  $0,99 \pm 0,09$  sehr ähnliche Ergebnisse verzeichneten.

Die Werte des Phosphor-Kreatinin-Quotienten reichten von  $0,26 \pm 0,42$  g/mmol Krea der Gruppe T1 bis  $1,23 \pm 2,33$  g/mmol Krea der Gruppe T3, mit im Verhältnis hohen Standardabweichungen.

### 4.8 Parameter des Kotes

#### 4.8.1 Optische Parameter

Die optischen Parameter des Kotes wurden im Rahmen der täglichen Untersuchungen erfasst. Abgesehen von der E.coli-Infektion, als der Kot eine gelblich-graue, wässrige Konsistenz aufwies, war der Kot der Versuchsgruppen dickbreiig und olivgrün-bräunlich gefärbt. Zu keiner Zeit waren Beimengungen wie Blut, Parasiten oder sonstige Fremdkörper im Kot zu finden.

Tabelle 4.34: Calcium-Kreatinin-Quotient und Phosphor-Kreatinin-Quotient (MW $\pm$ SD) im Urin der Tiere in den Versuchsgruppen

	Calcium mmol/mmol Krea		Phosphor g/mmol Krea	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>Kontrolle T1</b>	1,39	$\pm 0,82$	0,26	$\pm 0,42$
<b>Gruppe T2</b>	0,90	$\pm 0,58$	1,22	$\pm 2,58$
<b>Gruppe T3</b>	1,07	$\pm 0,32$	1,23	$\pm 2,33$
<b>Gruppe T4</b>	1,00	$\pm 0,44$	0,68	$\pm 1,08$
* p<0,05 vs. Kontrollgruppe T1				

#### 4.8.2 Parasitologische Parameter

Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise durch die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Veterinärwissenschaftliches Departement der LMU München, vorgenommen.

##### Flotationsverfahren

Im Flotationsverfahren auf Magen-Darmparasiten wurden für die männlichen Tiere der Gruppe T4 und der Gruppe T2 vereinzelt Isospora-Oozysten diagnostiziert. Bei den restlichen Tiere der Versuchsgruppen konnten mit diesem Verfahren keine Parasiten nachgewiesen werden.

##### MIFC

Mit Hilfe der MIFC (Merthiolat-Jod-Formalin-Concentration) konnten bei fast allen Gruppen vereinzelt Balantidium-Zysten nachgewiesen werden. Davon ausgenommen waren lediglich die weiblichen Tiere der Gruppen T3 und T4, welche laut MIFC keine Zysten aufwiesen.

Tabelle 4.35: Nährstoffgehalte im Futter der Versuchsgruppen nach Weender-Analyse

	<b>TS</b> % US	<b>Rp</b> % US	<b>Rfe</b> % US	<b>Rfa</b> % US	<b>Ra</b> % US
<b>Kontrolle T1</b>	90,52	18,04	5,14	3,79	5,99
<b>Gruppe T2</b>	90,38	18,09	5,04	4,06	5,83
<b>Gruppe T3</b>	90,01	18,00	4,70	3,79	5,71
<b>Gruppe T4</b>	90,20	17,86	5,01	3,83	5,71

## 4.9 Futterparameter

### 4.9.1 Weender-Analyse

Von dem Futter der Tiergruppen wurden die Trockensubstanz (TS), der Rohproteingehalt (Rp), der Rohfettgehalt (Rfe), der Rohfasergehalt (Rfa) sowie der Rohaschegehalt (Ra) bestimmt. Die Untersuchung erbrachte für die verschiedenen Gruppen sehr ähnliche Ergebnisse. Tabelle 4.35 gibt die prozentualen Anteile der ermittelten Werte wieder.

### 4.9.2 Stärke- und Gesamtzuckergehalt

Zusätzlich wurde an der LUFA-ITL GmbH Kiel der Stärke- und Gesamtzuckergehalt im Futter bestimmt. Tabelle 4.36 stellt die für alle Gruppen annähernd gleichen, ermittelten Werte in % US dar.

### 4.9.3 Energiedichte

Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von Frau Stadler an der Außenstelle Oberwiesenfeld des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik, Veterinärwissenschaftliches Department der LMU München durchgeführt.

Die ermittelten Werte der Energiedichte GE (gross energy) sind ebenfalls in Tabelle 4.36 ange-



Tabelle 4.36: Stärke- und Gesamtzuckergehalt sowie Energiegehalt im Futter der Versuchsgruppen

	<b>Stärke</b> % US	<b>Gesamtzucker</b> % US	<b>Energie</b> MJ GE/kg US
<b>Kontrolle T1</b>	39,9	4,6	17,34
<b>Gruppe T2</b>	39,7	4,6	17,42
<b>Gruppe T3</b>	39,4	4,7	17,27
<b>Gruppe T4</b>	40,1	4,6	17,44

Tabelle 4.37: Gehalt an Calcium, Phosphor und Natrium im Futter der Versuchsgruppen

	<b>Calcium</b> g/kg US	<b>Phosphor</b> g/kg US	<b>Natrium</b> g/kg US
<b>Kontrolle T1</b>	7,57	5,35	3,49
<b>Gruppe T2</b>	8,24	5,72	3,33
<b>Gruppe T3</b>	7,60	5,43	3,53
<b>Gruppe T4</b>	8,09	5,84	3,57

geben und wiesen zwischen den Gruppen nur sehr geringe Unterschiede auf.

#### 4.9.4 Mineralstoffgehalt

Von den vier Futtermischungen der Tiergruppen wurde der Calcium-, der Phosphor- und der Natriumgehalt im Futter bestimmt. Die Ergebnisse, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden, sind in Tabelle 4.37 dargestellt.

Tabelle 4.38: Erwarteter und tatsächlich ermittelter Vitamin D<sub>3</sub>- und 25-Hydroxycholecalciferolgehalt pro kg Futter der verschiedenen Gruppen

	<b>Erwarteter Zusatzstoffmenge</b>	<b>Ermittelte Zusatzstoffmenge</b>
<b>Kontrolle T1</b>	2000 IE Vitamin D <sub>3</sub>	1800 IE Vitamin D <sub>3</sub>
<b>Gruppe T2</b>	0,05 mg 25(OH)D <sub>3</sub>	0,04 mg 25(OH)D <sub>3</sub>
<b>Gruppe T3</b>	0,25 mg 25(OH)D <sub>3</sub>	0,21 mg 25(OH)D <sub>3</sub>
<b>Gruppe T4</b>	0,5 mg 25(OH)D <sub>3</sub>	0,41 mg 25(OH)D <sub>3</sub>

#### 4.9.5 25-Hydroxycholecalciferol

Von den verschiedenen Futtermischungen wurde der tatsächliche Gehalt des jeweiligen Zusatzstoffes pro kg Futter in den Laboratorien von DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) bestimmt.

Die vorgegebenen und tatsächlichen Werte sind in Tabelle 4.38 aufgeführt. Dabei fällt auf, dass der tatsächlich gemessene Gehalt der Zusatzstoffe etwas unter den angegebenen Mengen lag.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Fütterungsstudie ist es, die Auswirkungen verschiedener 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentrationen im Futter auf Leistung und Gesundheit von Absetzferkeln zu untersuchen. In einem sogenannten Toleranzversuch wurde dem Futter der Versuchstiere die empfohlene Dosis (1-fache Dosierung), die Zwischendosis (5-fach überdosiert) und die hohe Dosis (10-fach überdosiert) 25(OH)D<sub>3</sub> zugesetzt und mit einer Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierten Kontrollgruppe verglichen (siehe Tabelle 3.2).

Wie in verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (unter anderem MYRTLE und NORMAN (1971); YOSHIMOTO und NORMAN (1986); RENNIE und WHITEHEAD (1996); FRITTS und WALDROUP (2001)), hat der Einsatz von 25(OH)D<sub>3</sub> beim Geflügel gegenüber einer Supplementierung mit Vitamin D<sub>3</sub> Vorteile in der Wirksamkeit. Da es bis heute kaum Informationen zur Absorption und Deposition von 25(OH)D<sub>3</sub> beim Absetzferkel gibt, ist es von wissenschaftlichem Interesse, eine Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> bei dieser Tierart zu vergleichen.

Es wäre denkbar, dass die hohen Gaben von 25(OH)D<sub>3</sub> bei Absetzferkeln, vergleichbar einer Vitamin D-Intoxikation, makroskopisch Verkalkungen in Organen und Geweben, eine interstitielle Nephritis, Glomerulonephritis, Tubulonephrose, sowie eine katarrhalisch-hämorrhagische Gastroenteritis, interstitielle Pneumonie und Myokarddegeneration zur Folge haben könnten.

### 5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung

#### 5.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 24 weibliche und 24 männlich-kastrierte Absetzferkel, die alle aus demselben Betrieb stammten. Dadurch konnten genetische Einflüsse auf das Versuchsergebnis so gering wie möglich gehalten werden. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn sechs Wochen alt und wurden randomisiert nach Körpergewicht (durchschnittliches

Gewicht von 9,1 kg ( $\pm 0,93$  kg)) in acht Gruppen aufgeteilt. Durch diese Annäherung innerhalb der einzelnen Gruppen wurden von der Körpermasse ausgehende Beeinflussungen der Studie ausgeschlossen.

Es wurden je sechs Tiere in acht 7,6 m<sup>2</sup> großen Abteilen mit Sichtkontakt untereinander aufgestellt. Um eine artgerechte Tierhaltung zu ermöglichen und mögliche Langeweile mit eventuell damit verbundenem Kannibalismus zu vermeiden, wurde Beschäftigungsmaterial in Form von Ketten und Bite-Rites an den Buchtbegrenzungen angebracht. Um stallklimatische Einflüsse auf einzelne Gruppen auszuschließen, wurden die Versuchsgruppen und die Kontrollgruppe randomisiert auf die verschiedenen Buchten innerhalb des Stalls verteilt. Da die Abteile nur mit Gitterstäben voneinander abgetrennt waren, konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass geringste Futtermengen der unterschiedlichen Gruppen in die Nachbarbox gelangt sind. Diese geringen Mengen konnten die Versuchsergebnisse aber sicher nicht wesentlich beeinflussen.

Durch die Einhaltung der optimalen Stalltemperatur, Belüftung, natürliches Licht und bedarfsgerechte Wasserversorgung war, die dem Tieralter und der Tierart entsprechende, artgerechte Tierhaltung gegeben. Alle Tiere waren dem Sonnenlicht durch die Fensterscheiben in gleichem Maße ausgesetzt, wodurch auch dieser Faktor keinen Einfluss auf das Untersuchungsergebnis haben konnte.

### 5.1.2 Tierfutter und Dosierung der Wirkstoffkomponenten

Zur Reduzierung fütterungsbedingter Durchfälle der Absetzferkel wurden diese zunächst über einen Zeitraum von 9 Tagen restriktiv rationiert gefüttert. Danach wurde die Fütterung auf ad libitum umgestellt.

Das pelletierte Grundfutter basierte auf den Inhaltsstoffen Gerste, Weizen, Mais, Hafer und Kartoffeleiweiß (siehe Tabelle 3.1) und wurde von der Firma DSM Nutritional Products Ltd. bereitgestellt. Durch die Darreichung in Form von Pellets konnte gewährleistet werden, dass das Futter homogen ist und keine Entmischung stattfindet. Zudem wurde durch die Pellets eine exakte Zuteilung der verschiedenen Zusatzstoffe in der jeweiligen Dosierung sichergestellt.

Alle Tiere erhielten dasselbe Grundfuttermittel, in welches je nach Versuchsgruppe pro kg Futter 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub> (T1), 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (T2), 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (T3) oder 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (T4) eingemischt waren.

Um die vorgeschriebenen Gehalte zu überprüfen, fand am Ende des Versuchs eine Überprüfung des Futters auf die tatsächlichen Gehalte der Zusatzstoffe statt (siehe auch Kapitel 5.2.9).

### 5.1.3 Versuchsdurchführung

Über den gesamten Versuchszeitraum von 42 Tagen erfolgten tägliche, visuelle Erhebungen des Gesundheitszustandes der Versuchstiere und wöchentliche, klinische Einzeltieruntersuchungen sowie Wägungen. Im Rahmen der Tieruntersuchungen schenkte man vor allem möglichen Anzeichen einer Kalzinose durch die Verfütterung hoher 25(OH)D<sub>3</sub>-Mengen Beachtung, welche jedoch bis zum Ende des Versuches bei keinem Tier festzustellen waren.

Entsprechend den Vorgaben des Anhangs IV der Verordnung (EG) Nr. 429/2008 wurde die Mindestdauer für Toleranzstudien von 42 Tagen für abgesetzte Ferkel eingehalten.

Am Versuchsende wurden einmalig Blutproben der Einzeltiere, Urinproben der Tiere und Kotsammelproben der einzelnen Buchten entnommen.

Da eine Urinentnahme durch Cystozentese nicht von allen Tieren möglich war, sondern zum Teil nur vom urinierenden Tier mit Hilfe eines Bechers aufgefangen werden konnte, wurde darauf in Befunden der Urinstickuntersuchung, der pH-Wert-Messung, der Bestimmung des spezifischen Gewichtes und der Mikroskopie sowie in der statistischen Analyse Rücksicht genommen. Es stellte sich heraus, dass die unterschiedliche Art der Urinentnahme keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter hatte, sehr wohl aber der Tatbestand der Entnahme an sich. Der vom Stallboden aufgenommene Urin eines Tieres wurde nicht ausgewertet, da diese Probe nicht repräsentativ und vergleichbar mit den durch Cystozentese gewonnenen Proben ist. Nach der Euthanasie erfolgte eine pathologische Untersuchung von jedem Tier. Im Anschluss wurden die labortechnischen Parameter bestimmt.

Die Versuchsdauer entsprach mit 42 Tagen den Vorgaben der EFSA. Um festgestellte Unterschiede signifikant absichern und individuelle Tendenzen der Tiere besser ausschließen zu können, wären höhere Tierzahlen vorteilhaft gewesen.

Die während der Versuchsperiode festgestellten Veränderungen waren in keinen ursächlichen Zusammenhang zur Supplementierung mit 25-Hydroxycholecalciferol in den verschiedenen Dosierungen zu bringen. Ebenso verhält es sich mit den unterschiedlichen Befunden, die in der pathologischen Untersuchung sowie der Kot-, Urin- und Futteruntersuchung erhoben wurden.

Keines der Tiere zeigte Symptome einer Verkalkung der Organe und Weichgewebe, mit denen in der 10-fach überdosierten 25-Hydroxycholecalciferol-Gruppe gerechnet werden musste.

#### 5.1.4 Messparameter

Besonderes Augenmerk der Untersuchungen lag auf dem 25-Hydroxycholecalciferol selbst und dessen Auswirkungen auf den Organismus. In diesem Zusammenhang standen die Calcium-, Phosphor- und 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalte im Blut, die verschiedenen Knochenparameter (Knochenasche, Calcium, Phosphor, BAP, Bruchlastindex, Dehnung, sowie Knochendurchmesser, -länge und -gewicht) und die Höhe der 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalte in den Organen. Die Bedeutung dieser Parameter erklärt sich aus dem Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> und seinen Metaboliten auf die Calcium- und Phosphorhomöostase und auf den Knochenstoffwechsel, wie eingangs unter 2.1 ausführlich erläutert wird.

Gerade für die Knochenparameter des Schweines existieren zwar keine Referenzwerte, aber durch den Vergleich mit der Kontrollgruppe T1 und anderen Studien kann dennoch eine Aussage über die Auswirkungen des 25-Hydroxycholecalciferols getroffen werden.

Ebenso sind in der Literatur keine Referenzwerte für den Gehalt von 25(OH)D<sub>3</sub> im Blutplasma und den Organen der Schweine bekannt. Im Vergleich der Gruppen und zu anderen Studien sind jedoch deutliche Tendenzen zu erkennen und die Ergebnisse somit auch auszuwerten.

Wie zu erwarten war, erhöhten sich die 25-Hydroxycholecalciferolgehalte im Blutplasma und in den Organ- und Weichgeweben der Tiere statistisch signifikant. Vereinzelt wiesen die Parameter der Knochenuntersuchung geringe Unterschiede zwischen den Gruppen auf, allerdings waren diese nicht statistisch signifikant und nicht eindeutig auf die Supplementierung des Zusatzstoffes oder die Dosierung zurückzuführen.

Bei den weiteren Ergebnissen der Blutuntersuchung war kein Zusammenhang zum jeweils verabreichten Zusatzstoff oder dessen Dosierung festzustellen.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Gesundheitsstatus

Zwei Ferkel der Gruppe T3, in unterschiedlichen Buchten, zogen sich 14 und 17 Tage nach Versuchsbeginn Schnittverletzungen am Ohrgrund zu. Nach genauer Betrachtung der Buchten kamen als mögliche Ursachen nur Randleisten der stählernen Futtertröge in Betracht. In allen Buchten wurden daraufhin die Kanten und Leisten der Tröge abgerundet, wodurch weitere Verletzungen verhindert werden konnten. Da die zwei Tiere durch ihre geringfügigen Verletzungen keine Störungen des Allgemeinbefindens und des Fressverhaltens aufwiesen, wurden

sie weiter im Versuch belassen. Durch Reinigung und medikamentelle Versorgung der Wunden heilten diese gut aus und waren bis zum Versuchsende nicht mehr zu sehen.

16 Tage nach Verbringen der Schweine in den Versuchsstall erkrankte zuerst eines, dann mehrere Ferkel (vornehmlich der Gruppe T3) an einem wässrigen, gelb-braunen Durchfall und zeigten ein reduziertes Allgemeinbefinden und struppiges Haarkleid.

Als Differenzialdiagnosen kommen in dieser Altersgruppe vornehmlich eine Coronavirusinfektion oder eine bakterielle Infektion mit *Escherichia coli* infrage. In den Kotproben verschiedener Tiere, die an das Institut für Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Veterinärwissenschaftliches Department der LMU München übersandt wurden, konnten hämolysierende *E. coli* (+++) und andere Enterobakterien nachgewiesen werden. Nach einer metaphylaktischen und therapeutischen Behandlung aller Ferkel mit Colistinsulfat und Einzeltierbehandlungen mit Enrofloxacin und Dexamethason (siehe auch 4.1) verschwanden die Durchfallsymptome bei allen Tieren innerhalb von 3-5 Tagen nach Beginn der Behandlung.

Bei der *Escherichia coli*-Diarrhoe handelt es sich um einen sekretorischen Durchfall. Dieser entsteht, wenn sich enterotoxinbildende Stämme von *E. coli* (ETEC) im oberen Dünndarm massenhaft vermehren. Trotz der Anheftung der Bakterien am Bürstensaum der Darmepithelien mit Hilfe von Fimbrien oder Pili-Antigenen, ist die Dünndarmschleimhaut meist nur wenig oder nicht geschädigt. Unter der Einwirkung der gebildeten Enterotoxine ist die Sekretion in den Dünndarm abnorm gesteigert, während die Resorptionsfunktion weitgehend erhalten bleibt. Die Krankheitserscheinungen bei typischer Colidiarrhoe bestehen ausschließlich in einer Exsikkose infolge des Flüssigkeitsverlustes (WALDMANN und PLONAIT, 2004).

Bei Absetzferkeln wird die Krankheitsentwicklung durch Futterumstellung und Fütterungsfehler, die die Vermehrung der Erreger begünstigen, beeinflusst. Ferkel, die während der Laktation reichlich mit Antikörpern versorgt waren, hatten keine Gelegenheit eine aktive Immunität aufzubauen und sind nach dem Absetzen besonders anfällig (HEINRITZI, 2006b).

Auf Grund der Durchfallproblematik und der damit verbundenen kürzeren Verweildauer des Futterbreis im Magen-Darmkanal, muss davon ausgegangen werden, dass in diesen Tagen etwas niedrigere Resorptionsraten des Versuchsfutters erzielt wurden. Da die Tiere aber sehr gut auf die Behandlung ansprachen und sich die Durchfallsymptomatik innerhalb weniger Tage schnell besserte, wurde der Versuch nicht abgebrochen, sondern wie geplant fortgeführt.

Ein Ferkel verendete an den Folgen der *E. coli*-Infektion. Die pathologische Untersuchung (Institut für Pathologie, Tierklinisches Department der LMU München) ergab keinen zusätzlichen Befund, der auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen diesem Todesfall und der Fütterung hinwies.

Im weiteren Verlauf der Studie kam es zu keinen weiteren Todesfällen.

Im gesamten Versuchszeitraum konnten keine gesundheitlichen Veränderungen festgestellt werden, die ursächlich in Zusammenhang mit der 25(OH)D<sub>3</sub>-Wirkung standen. Dieser Tatbestand wurde später durch die patho-histologische Untersuchung bestätigt.

## 5.2.2 Mastleistungsparameter

### Futterraufnahme

Die Futterraufnahme wurde bestimmt, um eine mögliche Inakzeptanz des Futters durch die Schweine, oder andere Ursachen einer Verzehrsdepression festzustellen. Jede Form der Erkrankung, der Unverträglichkeit oder der verringerten Schmackhaftigkeit des Futters schlägt sich sofort in einer verringerten Futterraufnahme nieder. Die Akzeptanz der verschiedenen Futtermischungen war in allen Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg gut, was für eine gute Verträglichkeit von 25-Hydroxycholecalciferol spricht.

Da die Ferkel in Gruppen gehalten wurden und gemeinsamen Zugang zu den Futtertrögen hatten, konnte von jeder Versuchsgruppe nur die durchschnittliche Futterraufnahme ermittelt werden. Die tägliche Futterraufnahme pro Tier und Tag stellt somit einen errechneten Wert dar. Die Ferkel der einfach dosierten 25(OH)D<sub>3</sub>-Gruppe T2 zeigten eine um 7,7% höhere tägliche Futterraufnahme gegenüber den anderen Gruppen, was eine bessere Akzeptanz vermuten lässt. Diese Differenzen sind statistisch nicht signifikant und besitzen somit eine geringe Aussagekraft.

In ihren Vergleichsfütterungen zwischen 25(OH)D<sub>3</sub>, einfach dosiert, und Vitamin D<sub>3</sub> bei Absetz- und Mastschweinen konnten KLUGE et al. (2006) und JAKOBSEN et al. (2007) keine Unterschiede in der Futterraufnahme der Tiere und deren Lebendmasseentwicklung feststellen.

### Lebendmasseentwicklung und Futtermittelverwertung

Durch die randomisierte Zuteilung der Tiere nach Körpermasse wiesen die Ferkel zu Beginn der Studie pro Gruppe ähnliche Körpermassen auf. Mit diesem Verfahren konnten mögliche Abweichungen der Zielparameter der Tiere, die auf einer unterschiedlichen Körpermasse beruhen, innerhalb der Gruppe ausgeglichen werden.

Mit Hilfe des wöchentlichen Wiegens wurde die Entwicklung der Körpermassen der einzelnen Tiere festgehalten. Grundsätzlich zeigten die Tiere ähnliche Zunahmen, wobei die Ferkel der



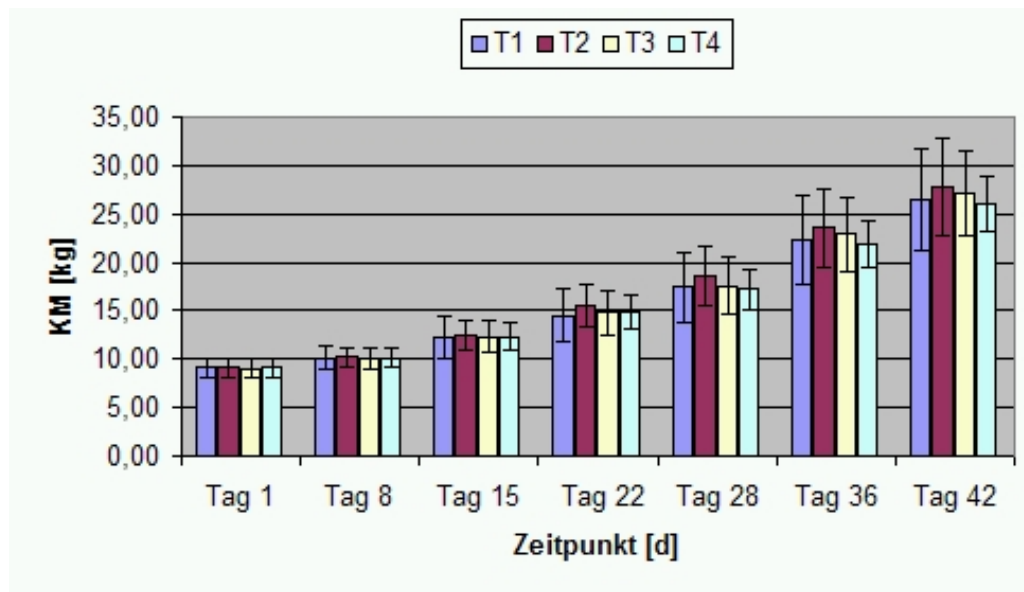


Abbildung 5.1: Entwicklung der durchschnittlichen Körpermassen der Tiere (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen im Versuchszeitraum [T1: 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, T2: 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (10x)]

einfach dosierten 25(OH)D<sub>3</sub>-Gruppe T2 versus der Kontrollgruppe T1 um 7,4% höhere Zunahmen verzeichneten. Auch die 5-fach überdosierte 25(OH)D<sub>3</sub>-Gruppe T3 wies am Ende des Versuches ein um 4,3% höheres Endgewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dagegen lagen die Tiere der 10-fach überdosierte 25(OH)D<sub>3</sub>-Gruppe T4 mit 2,3% geringeren Zunahmen knapp unter der Kontrollgruppe.

Die unterschiedlichen Zunahmen sind in Abbildung 5.1 dargestellt ohne statistisch signifikante Differenzen aufzuweisen.

In der Vergleichsstudie von JEFFRIES et al. (2002) zwischen Vitamin D<sub>3</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> entwickelten alle Ferkel bis zur 16. Versuchswoche ähnliche Körpermassen. Ab Woche 21 erzielten die mit 25(OH)D<sub>3</sub> behandelten Tiere signifikant höhere Körpermassen, wobei die Autoren darauf hinweisen, dass die Ergebnisse auf Grund der relativ geringen Ferkelzahl von 200 Tieren zu keiner statistisch sicheren Aussage führen würden.

Die Futterverwertung (kg Futteraufnahme/kg Lebendmassezunahme) der Kontrollgruppe und der Gruppe T2 (1-fach dosiertes 25(OH)D<sub>3</sub>) waren mit 1,70 und 1,69 nahezu identisch. Dagegen benötigte die Gruppe T3 (5-fach überdosierte 25(OH)D<sub>3</sub>) nur 1,56 kg Futter pro kg LMZ, also etwa 8,2% weniger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit 4,1% weniger benötigtem Futter pro kg LMZ versus der Kontrollgruppe, lag die Gruppe T4 (10-fach überdosierte 25(OH)D<sub>3</sub>) zwischen der guten Futterverwertung der Gruppe T3 und jener der Gruppen T1 und T2 (siehe Abb. 5.2).

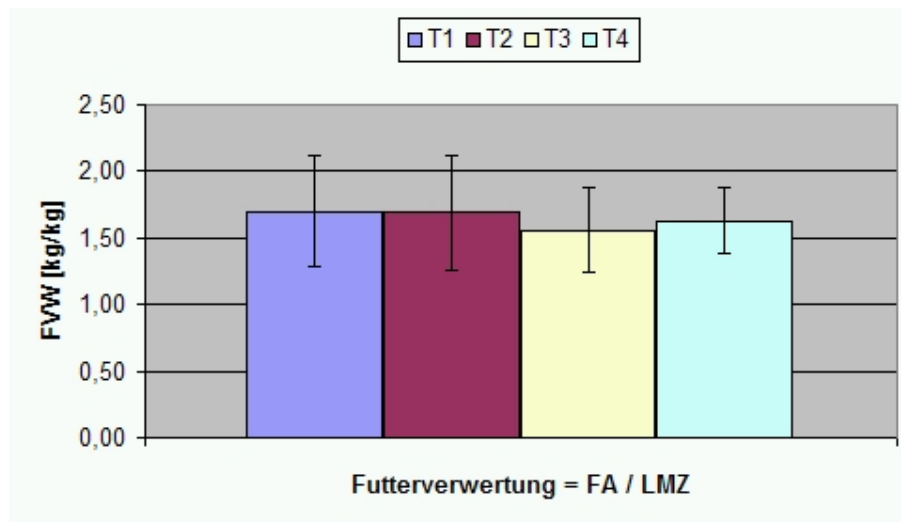


Abbildung 5.2: Durchschnittliche Futterverwertung der Tiere (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen im Versuchszeitraum [T1: 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, T2: 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (10x)]

Eine verbesserte und damit niedrigere Futterverwertung ist nur durch das optimale Verhältnis von Futteraufnahme zu Lebendmassezunahme zu erreichen, und kann einen Hinweis auf die gute Verträglichkeit des Produktes geben. Würde sich, wie anfangs vermutet, die 5- und 10-fache Überdosierung von 25(OH)D<sub>3</sub> negativ auf die Toleranz durch die Ferkel auswirken, würde sich die Futterverwertung im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verbessern. Es bestehen somit keinerlei Hinweise auf eine Unverträglichkeit des verabreichten Zusatzstoffes in den jeweiligen Dosierungen.

Ob die Ergebnisse nur individuelle Tendenzen oder tatsächlich auf den supplementierten Metaboliten zurückzuführende Wirkungen darstellen, müsste in weiteren Versuchen mit größeren Tierzahlen abgeklärt werden, da andere bisher durchgeführte Studien mit 25(OH)D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> bei Schweinen keine Unterschiede in der Lebendmasseentwicklung und der Futterverwertung feststellen konnten (KLUGE et al., 2006; JAKOBSEN et al., 2007).

### 5.2.3 Patho-histologische Parameter

Die Ferkel wurden mit Pentobarbital Natrium (400 mg/1 ml Eutha® 77) 0,1-0,2 ml/kg KG euthanasiert und anschließend zur weiteren Untersuchung in das Institut für Tierpathologie, Tierklinisches Department der LMU München, gebracht. Pentobarbital Natrium ermöglicht eine stressfreie Euthanasie, da die Tiere durch den Wirkstoff schnell sediert sind und den Todes-

kampf somit nicht mehr bewusst wahrnehmen. Der durch den Todeskampf verursachte Stress hätte Auswirkungen auf verschiedene Parameter, wie beispielsweise der AST im Blut. Zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe waren in Bezug auf die Folgen der Euthanasie keine Unterschiede festzustellen.

### **Organmassen**

Am Versuchsende erfolgte die Bestimmung der Organmassen von Herz, Lunge, Leber, Milz, sowie der rechten und linken Niere. Dabei waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass alle Ferkel, unabhängig von der supplementierten Substanz und Dosierung, eine physiologische Entwicklung durchlaufen hatten. Desweiteren waren keine Hinweise auf Verkalkungen der Gewebe festzustellen.

### **Makroskopische und histologische Parameter**

Der Euthanasiewirkstoff Pentobarbital Natrium gehört der Wirkstoffklasse der Barbiturate an und wird sowohl zur Anästhesie, als auch in Überdosierung zur Euthanasie eingesetzt. Eine Überdosis verursacht bei schneller Injektion eine Lähmung medullärer Zentren mit Atemstillstand. Das Herz schlägt weiter, bis Hypoxämie und Hyperkapnie zu einem Herzstillstand führen.

Durch das Kreislaufversagen stoppt die Blutzirkulation, was eine Blutfülle in den einzelnen Organsystemen zur Folge hat. Post mortem können, wie bei den vorliegenden Versuchstieren, akute Stauungshyperämien der Lunge, Leber, Milz und der Nieren beobachtet werden. Der akute Rückstau des Blutes in den Lungenkreislauf führt zu einem Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe, was das Auftreten der Lungenödeme erklärt.

Bei 14 Tieren, verteilt in allen Gruppen, wurde eine gering- bis mittelgradige Hyperkeratose der Pars proventricularis des Magens diagnostiziert, wobei es sich um Erosionen der Magenschleimhaut in der Umgebung der Ösophagusmündung handelt. Dieser Bereich ist mit einer kutanen Schleimhaut ohne schleimproduzierende Drüsen ausgekleidet und damit ungeschützt gegenüber der Einwirkung des Magensaftes. Eine beschleunigte Magenentleerung durch faserarmes, feinkörniges Futter stellt dabei einen wesentlichen Faktor dar. Weitere mögliche Ursachen sind hitzebehandeltes Getreide während Trocknung und Pelletierung, sowie Stress der Tiere durch Stallwechsel, Transport und enge Aufstallung (HEINRITZI, 1987; WONDRA et al., 1995).

Im Falle der Versuchstiere kann angenommen werden, dass das pelletierte Futter den Auslöser der leichten Magenulzera darstellte. Diese waren jedoch von so geringem Ausmaß, dass das Allgemeinbefinden der Tiere dadurch nicht beeinträchtigt wurde.

Die makroskopischen und histologischen Befunde einiger Tiere am Darmtrakt, wie Hyperplasie des GALT (gut associated lymphoid tissue), katarrhalischer Enteritis, Hyperplasie der mesenterialen Lymphknoten, herdförmige Schleimretention in Krypten des Dickdarms mit Dilatation und Herniation in das angrenzende GALT und oberflächliche Epithelnekrosen, deuteten auf eine Infektion mit *Brachyspira* spec. hin. Zudem wurde bei drei Tieren eine Infektion mit Coronaviren nachgewiesen. Das Ergebnis einer Untersuchung auf das Circovirus PCV2, die bei manchen Tieren auf Grund der vergrößerten Lymphknoten eingeleitet wurde, war jeweils negativ.

Da die Tiere kein gestörtes Allgemeinbefinden zeigten und der Kot größtenteils dickbreiig bis geformt war, ist davon auszugehen, dass diese Darmerkrankungen eher eine untergeordnete Rolle gespielt haben. Trotzdem sollen beide Infektionen an dieser Stelle kurz dargestellt werden.

Bei einer Coronavirus-Infektion, auch Transmissible Gastroenteritis (TGE) genannt, handelt es sich um eine meldepflichtige, osmotische Virusdiarrhoe. Coronaviren befallen die Enterozyten der Darmzotten, vornehmlich im Bereich des Jejunums und Ileums und führen zu deren Schädigung und beschleunigter Degeneration. Das zerstörte Zottenepithel wird durch Kryptenzellen ersetzt, welche die digestiven und absorptiven Funktionen nicht übernehmen können. Die Resorptionskapazität für Natrium, Chlorid, Monosaccharide und wahrscheinlich auch Aminosäuren wird stark reduziert (HEINRITZI, 2006b). Über drei Wochen alte Schweine sind weniger empfänglich gegenüber der TGE. Zudem ist die Schädigung des Dünndarmepithels bei älteren Tieren weniger weitgehend als bei Saugferkeln und wechselt im Ausmaß. Wenn die restlichen Epithelzellen zur Aufrechterhaltung der physiologischen Resorption ausreichen, hat die Infektion keinen Durchfall zur Folge, obwohl Virusausscheidung und spätere Antikörperbildung stattfinden (WALDMANN und PLONAIT, 2004).

Im vorliegenden Fall handelte es sich wahrscheinlich nicht um ein akutes Geschehen sondern einen chronisch infizierten Bestand ohne klinische Erscheinungen.

Bei der Durchfallproblematik ab Tag 16 des Versuches wurde schon eine Coronavirusinfektion vermutet, wobei zu diesem Zeitpunkt die *E.coli*-Erkrankung im Vordergrund stand, was durch die Befunde und das schnelle Ansprechen auf die Therapie bestätigt wurde.

Der Erreger der Dysenterie, *Brachyspira hyodysenteriae*, wird mit dem Kot ausgeschieden und durch direkten oder indirekten Kotkontakt aufgenommen. Eine Infektion mit *Brachyspira hyodysenteriae* kann klinisch inapparent oder als Dickdarmentzündung unterschiedlicher Schwere und Ausdehnung verlaufen. Zum Ausbruch der Erkrankung tragen resistenzmindernde Faktoren, wie Stallwechsel, Transport, Futterumstellung oder schlechtes Stallklima entscheidend bei. Der Erreger haftet sich an die Krypten der Dickdarmschleimhaut, beginnt sich dort zu vermehren und dringt in die Becher- und Epithelzellen ein. Es erfolgt die Bildung von Hämolysin und Endotoxin. Dadurch kommt es zur Schleimsekretion und späteren Zellproliferation. Im weite-

ren Verlauf werden diese Zellen zerstört und es entwickelt sich innerhalb weniger Tage eine massive Entzündung mit Schleimhautödem und mukös-fibrinöser Exsudation. Zusätzlich kann es durch Erosion von Blutgefäßen der Schleimhaut zu einem Blutverlust kommen. Der Flüssigkeitsverlust resultiert aus mangelnder Rückresorption, einer Störung der Transportmechanismen und aus einer sich entwickelnden Hypersekretion (AMTSBERG und MERKT, 1986; HEINRITZI, 2006b).

Da die Versuchstiere nach der Behandlung der E.coli-Infektion kein gestörtes Allgemeinbefinden und größtenteils einen dickbreiigen bis geformten Kot hatten, kann hier von einer klinisch inapparenten Erkrankung ausgegangen werden, die das Wohlbefinden der Tiere nicht sehr stark eingeschränkt hat und somit eine medikamentelle Behandlung auch nicht zwingend nötig gewesen wäre. Zudem hatte das Geschehen keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis, da die Tiere ein ungestörtes Allgemeinbefinden und auch keine verminderte Futteraufnahme aufwiesen.

Der Verdacht einer Balantidium-Infektion lag nach der pathologischen Untersuchung bei einem Ferkel vor. Dieser Verdacht wurde durch die parasitologische Kotuntersuchung bestätigt. Die zu den Ziliaten gehörenden Balantidium coli sind weitverbreitete Kommensale des Schweinedickdarms. Nach primärer Schädigung der Mucosa kann es durch die vorherige Infektion mit anderen Erregern oder bei hochgradiger Resistenzschwächung in die Drüsengänge eindringen und diese zerstören. Es ist unklar, inwieweit die möglichen Symptome einer katarrhalischen bis hämorrhagischen Kolitis und Typhilitis primär oder gleichzeitig auf einer Schweinedysenterie-Erkrankung beruhen (HÄNI und HÖRNING, 1974; WALDMANN und PLONAIT, 2004).

Ein Ferkel zeigte eine einzelne Nierenzyste. Dabei handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Entwicklungsanomalie, die sporadisch oder durch Vererbung auftreten kann, wobei die Funktion der Niere dadurch nicht beeinträchtigt wird (WEISS, 2007).

Die erhöhte Anzahl pathologischer Befunde in den Gruppen T2 und T4 ist dadurch zu erklären, dass bei diesen Tieren zusätzlich zur makroskopischen auch eine histologische, und somit intensivere Untersuchung durchgeführt wurde. Mit der histologischen Untersuchung sollten eventuelle Verkalkungen im Anfangsstadium, die makroskopisch noch nicht nachweisbar sind, sichtbar gemacht werden.

Die pathologischen Untersuchungen sind von unabhängigen Gutachtern erstellt worden, für die lediglich die Tiernummer, nicht aber die Gruppenzugehörigkeit ersichtlich war.

Bei einer Vitamin D-Intoxikation sind mikroskopisch die Degeneration der elastischen Fasern von Intima und Media der Aorta und anderen Arterien, sowie dystrophische Verkalkungen an diesen Stellen zu erkennen. Die Kollagenfasern der Grundsubstanz können ebenfalls betroffen

sein und reißen. Diese Veränderungen sind in unterschiedlichem Maße auch an den anderen Weichgeweben zu finden.

Keiner der beschriebenen Befunde und Erkrankungen kann auf die Supplementierung von Vitamin D<sub>3</sub> oder 25(OH)D<sub>3</sub>, weder in der einfachen, noch in der fünf- oder zehnfachen Dosierung zurückgeführt werden.

#### **5.2.4 Parameter der Blutuntersuchung**

Bei allen Ferkeln wurde am vorletzten Versuchstag Blut entnommen und anschließend ein großes Blutbild, sowie serologische Parameter bestimmt.

##### **Hämatologie**

Nahezu alle Parameter der hämatologischen Untersuchung lagen im Referenzbereich und wiesen zwischen den Gruppen nur geringe Unterschiede auf. Die davon abweichenden, geringfügig erniedrigten Hämoglobinwerte aller Gruppen und erniedrigten Hämatokritwerte der Gruppe T4, können in einer Hämolyse der Blutproben begründet sein, wobei sich die Veränderungen in einem sehr geringen Rahmen befinden. Da der Hämoglobingehalt aller Gruppen etwas zu niedrig war, fiel als Folge auch der MCH-Wert zu gering aus, da es sich hierbei um einen rechnerisch ermittelten Parameter handelt.

Die Leukozyten und das Differentialblutbild waren bei keiner Gruppe erhöht, was im Falle eines akuten Krankheitsgeschehens der Fall gewesen wäre. Zudem waren alle Ferkel zum Zeitpunkt der Blutentnahme in ihrem Allgemeinbefinden ungestört. Diese Ergebnisse bestätigen die in Kapitel 5.2.3 getroffene Aussage, dass kein Ferkel akut an Dysenterie oder Transmissibler Gastroenteritis erkrankt war.

Da auch die eosinophilen Granulozyten im Normbereich lagen, ist ein massiver Parasitenbefall auszuschließen, und somit sind die Ergebnisse der parasitologischen Untersuchung (siehe Kapitel 4.8.2) als Nebenfund einzustufen.

Alle Parameter der hämatologischen Untersuchung waren somit unauffällig und in keinen ursächlichen Zusammenhang zum supplementierten Zusatzstoff, bzw. dessen Dosierung zu bringen.

##### **Klinisch-chemische Parameter**

Die Messwerte der einzelnen Parameter unterliegen bei gesunden Schweinen biologischen Variationen, die unter anderem von genetischen Unterschieden, also von der Rasse abhängig sind. Dieser Sachverhalt ist unter anderem bei den Enzymen AST und GGT zu beachten. Da-

neben üben Faktoren wie Geschlecht, Alter, Gewicht und Fortpflanzungsstadium einen Einfluss auf verschiedene Parameter und deren Referenzwerte aus (MERK, 1992).

Die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) ist in Membranstrukturen lokalisiert und führt nur im Falle einer Erkrankung der Leber und Gallengänge zu einer Aktivitätssteigerung, sodass die GGT als leberspezifisch angesehen werden kann (KRAFT et al., 2005). Somit könnten die geringgradig erhöhten GGT-Werte für eine Durchfallerkrankung mit Erregerbefall der Leber sprechen.

Allerdings beziehen sich die angegebenen Referenzwerte auf die Schweinerasse Deutsche Landrasse, wobei im vorliegenden Versuch eine Kreuzung aus Deutscher Landrasse x Large White x Piétrain eingesetzt wurde. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die erhöhten GGT-Werte rassebedingt zustande kamen, was bei den geringen, gleichmäßigen Erhöhungen wahrscheinlich ist.

Das Enzym Aspartat-Amino-Transferase (AST) kann in unterschiedlicher Aktivität in zahlreichen Geweben und Organen angetroffen werden und ist somit keineswegs organspezifisch. Hohe Aktivitäten werden im Herz- und Skelettmuskel nachgewiesen, in zweiter Linie auch in der Leber. Aktivitätssteigerungen bis zum Dreifachen können als leichte Erhöhung bezeichnet werden (KRAFT et al., 2005). Auch die Aktivitätssteigerung im Falle der AST kann rassebedingt verursacht sein.

Eine andere Ursache könnte die Blutentnahme darstellen. Diese bedeutet für Schweine einen erhöhten Stress (Herausfangen, Fixation, Abwehrreaktionen), wodurch eine Belastungsmypathie zustande kommen kann, in deren Folge die AST erhöht ist. Schweine bestimmter Rassen mit Züchtung auf einen hohen Muskelfleischanteil am Schlachtkörper, wie z.B. Piétrain, Belgische Landrasse und Kreuzungen dieser Rassen mit Schweinen der Deutschen Landrasse, sind genetisch verstärkt empfänglich gegenüber stressbedingter Belastungsmypathien (HEINRITZI und PLONAIT, 2004).

Welche der beiden möglichen Ursachen im vorliegenden Fall zutrifft, ist nicht genau zu sagen. Fest steht allerdings, dass die Erhöhung der AST sehr wahrscheinlich nicht mit einem krankhaften Geschehen zusammenhängt und keinen Zusammenhang mit der Supplementierung der Zusatzstoffe und Dosierungen aufweist.

Die alkalische Phosphatase (AP) ist in fast allen Geweben des Organismus in unterschiedlicher Aktivität nachzuweisen. Zu diesen Geweben gehören Osteoblasten, Darmschleimhaut, Plazenta, Nierentubuluszellen, Gallengangsepithel, Leber und Leukozyten (KRAFT et al., 2005). Die AP ist an Membranstrukturen der Zellen gebunden, wobei sie weder als leberspezifisches, noch als knochenspezifisches Enzym anzusehen ist. Die AP in Osteoblasten besitzt bei Jungtieren eine wesentlich höhere Enzymaktivität als bei adulten Tieren, was bei der Beurteilung zu be-

rücksichtigen ist.

Spezifischer für Hinweise auf den Knochenstoffwechsel ist dagegen die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) (EPSTEIN, 1988; DELMAS, 1991; WITHOLD et al., 1996). Da für dieses Enzym zum momentanen Zeitpunkt keine Referenzwerte für Absetzferkel oder Schweine existieren, können die Werte nur untereinander und mit einer anderen Studie verglichen werden. Die Enzymaktivitäten in der vorliegenden Studie, die zwischen Werten von  $92 \text{ U/l} \pm 29$  (T1) und  $115 \text{ U/l} \pm 24$  (T2) lagen, wiesen nur geringe Unterschiede auf und sind vergleichbar mit den BAP-Ergebnissen einer Studie von LIESEGANG et al. (2002), in der die Enzymaktivität der Absetzferkel ebenfalls zwischen 90 und 110  $\text{U/l}$  lag.

Sowohl die Natriumwerte in den Gruppen T1 und T3, als auch die Chloridwerte aller Gruppen waren geringgradig erniedrigt. Dies könnte zum einen eine verminderte Resorption in Folge der klinisch inapparenten Coronavirusinfektion verdeutlichen, oder aber noch im Bereich der natürlichen Schwankungen liegen.

Betrachtet man die Phosphorwerte im Serum der Versuchstiere, so fällt auf, dass alle Tiere im Durchschnitt erhöhte Werte im Vergleich zum angegebenen Referenzwert aufwiesen, welcher für adulte Tiere angegeben ist. Eine geringe Hyperphosphatämie ist beim Jungtier allerdings physiologisch (KRAFT et al., 2005) und stellt somit kein Anzeichen eines krankhaften Geschehens dar.

Die Ermittlung des  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Gehalts im Plasma wurde in den Laboratorien von DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) durchgeführt.

Der  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Gehalt im Plasma nahm von Gruppe T1 bis Gruppe T4 dosisabhängig deutlich zu (siehe Abbildung 5.3). Dabei ergaben die Gehalte im Plasma der Gruppe T3 mit 14-fach und der Gruppe T4 mit 22-fach höheren Werten statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrollgruppe T1. Es ist somit ein direkter Zusammenhang zwischen der über das Futter verabreichten  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Menge und dem  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Gehalt im Plasma zu erkennen, was in der Vergleichsstudie von KLUGE et al. (2006) ebenfalls beobachtet werden konnte.

$25(\text{OH})\text{D}_3$  wird besser und schneller absorbiert als natives Vitamin D (??). Mehrere Studien konnten zeigen, dass Vitamin D vor allem in die Lymphe absorbiert wird (THOMPSON et al., 1966; BLOMSTRAND und FORSGREN, 1967), wohingegen  $25(\text{OH})\text{D}_3$  in physiologischen Konzentrationen als stärker polarer Metabolit schneller und effektiver absorbiert wird. Dies erfolgt auf direktem Weg aus dem proximalen Jejunum in die Pfortader und geschieht unabhängig von der Fettresorption (NECHAMA et al., 1977; MAISLOS et al., 1981; SITRIN et al., 1982). Dadurch lassen sich die trotz vermeintlich äquivalenter Vitamin D-Fütterung der Gruppen T1 und T2 höheren  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Gehalte im Plasma der Gruppe T2 gegenüber der Gruppe T1 er-



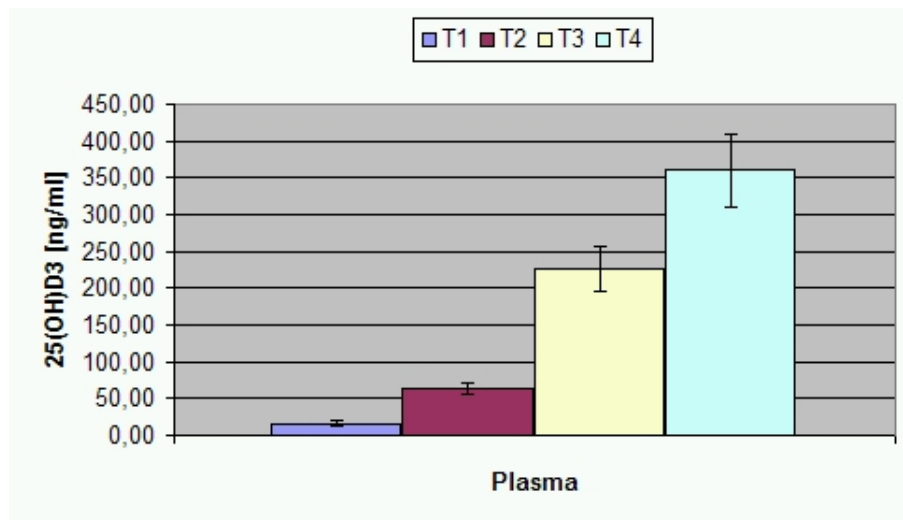


Abbildung 5.3: Durchschnittlicher 25-Hydroxycholecalciferolgehalt (MW±SD) im Plasma der Versuchsgruppen [T1: 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, T2: 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (10x)]

klären.

Die statistisch signifikant höheren Werte der Gruppen T3 und T4 wurden durch die erhöhte Zufuhr über das Futter verursacht. Allerdings nahm der 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalt von T3 zu T4 in geringerem Umfang zu, als von T2 zu T3, trotz Verdopplung der supplementierten 25(OH)D<sub>3</sub>-Menge. Dies lässt eine gewisse Sättigung des 25(OH)D<sub>3</sub>-Spiegels im Plasma vermuten.

Hinsichtlich der anderen, in dieser Studie untersuchten Blutparameter des großen Blutbildes und der klinisch-chemischen Untersuchung (GLDH, AP, Glucose, Harnstoff, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß, Albumin, Kreatinin, Gesamtcalcium und Kalium) bestanden nur geringgradige Auffälligkeiten, weshalb an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden soll.

Weder die Verabreichung von Vitamin D<sub>3</sub>, noch die von 25(OH)D<sub>3</sub> in den unterschiedlichen Dosierungen, verursachte eine negative Veränderung des Blutbilds der Ferkel.

### 5.2.5 Knochenparameter

#### Knochenlänge, -durchmesser und -masse

Beim Vergleich der absoluten Zahlen für Knochenlänge, Knochendurchmesser und Knochenmasse fallen keine Unterschiede auf, die auf den Futterzusatzstoff schließen lassen.

Da sich der Knochenbau zeitlebens an verändernde Bedingungen anpasst und damit auch

Knochenlänge, Knochendurchmesser und Knochenmasse von der Körpermasse abhängig sind, wurde diese in den Berechnungen berücksichtigt und die Parameter auf 10 kg Körpermasse bezogen.

Im Vergleich der Gruppen unter diesem Gesichtspunkt wurde deutlich, dass die Kontrollgruppe T1 für alle drei Parameter die höchsten Werte aufwies, auch wenn die Differenz zu den anderen Gruppen nur sehr gering ausfiel. Die einfach dosierte 25(OH)D<sub>3</sub>-Gruppe T2 besaß dagegen die niedrigsten Werte, die mit steigender Dosierung der Gruppen T3 und T4 annähernd bis auf den Wert der Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppe anstiegen.

Ob dies zufällige, individuelle Tendenzen sind oder tatsächlich eine Aussage über die Wirkung der Supplemente auf das Knochenwachstum getroffen werden kann, ist anhand der geringen Tierzahl und fehlender statistisch signifikanter Unterschiede nur schwer zu sagen. Bei einer tatsächlichen Einflussnahme würden diese Ergebnisse bedeuten, dass Vitamin D<sub>3</sub> im Vergleich zu 25(OH)D<sub>3</sub> eine stärkere Wirkung auf Osteoblasten ausübt, welche während der Wachstumsvorgänge der Absetzferkel zu einer vermehrten Knochenbildung im Bereich der Wachstumsfugen angeregt werden. Dabei würde nicht nur das Längen- und Breitenwachstum der Knochen stimuliert, sondern auch die Mineralstoffeinlagerung in die anorganische Knochenmatrix, was in einer höheren Knochenmasse resultieren würde.

### **Knochenaschegehalt und Mineralstoffe**

Da während des Veraschungsprozesses alle organischen Bestandteile verbrennen, enthält die Knochenasche die gesamten Mineralstoffe. Somit gibt der Aschegehalt des Knochens Auskunft über die in die Knochematrix eingelagerten Mineralien.

In dieser Studie wurde für eingehende Untersuchungen der Knochenzusammensetzung die Knochenasche, nicht aber die Trockensubstanz benötigt, weshalb auf die Ermittlung der fettfreien Trockensubstanz der Knochen verzichtet wurde. Aus diesem Grund ist im Tiergruppenvergleich der Bezug des Aschegehaltes zur ursprünglichen Substanz von Bedeutung.

Der Einsatz von 25(OH)D<sub>3</sub> in steigender Dosierung zeigte keine Veränderung im Aschegehalt im Vergleich zur Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppe, was für eine gleichmäßige und ausreichende Einlagerung der Mineralstoffe in die Knochenmatrix aller vier Gruppen spricht. Diese Erkenntnis bestätigen die Ergebnisse der Studie von KLUGE et al. (2006), die ebenfalls keine Anzeichen einer unzureichenden Mineralisierung hinsichtlich Längenmaße, Durchmesser, Wandstärke und Bruchfestigkeitstest in ihrem Vergleich von Vitamin D<sub>3</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> feststellen konnten.

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Calcium- und Phosphorgehalte der Knochenasche, die nur geringgradige Unterschiede zwischen den Gruppen aufwiesen, konnte ebenfalls keine ursächliche Beziehung zwischen der Dosierung des jeweiligen Zusatzstoffes und den ermittelten

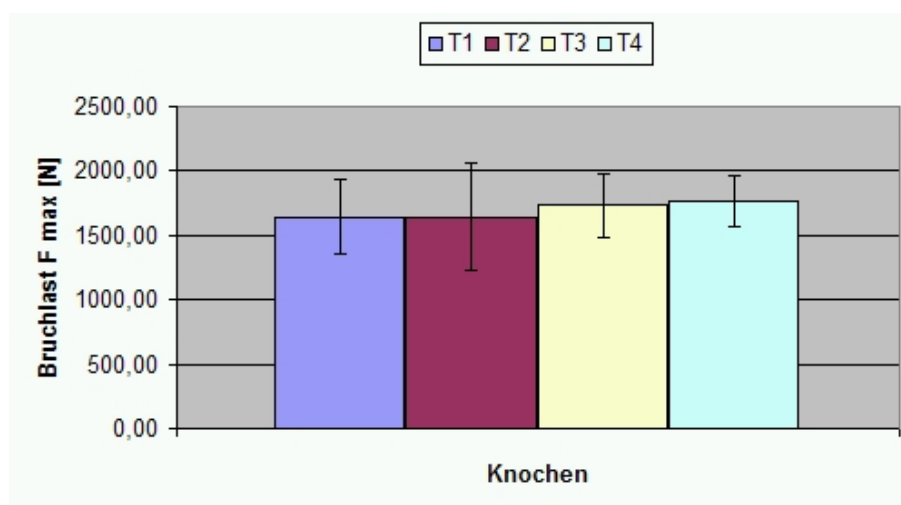


Abbildung 5.4: Durchschnittliche Bruchlast der Knochen (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen [T1: 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, T2: 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (10x)]

Werten festgestellt werden.

### Bruchlast und Dehnung

Hinsichtlich der Bruchlast und Dehnungsfähigkeit der Versuchstierknochen sind Tendenzen für stabilere Knochen durch steigende 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosierungen zu erkennen. Die gemessenen Unterschiede sind statistisch nicht signifikant und widersprechen der Aussage von KLUGE et al. (2006), die keine Beeinflussung der Parameter der Bruchfestigkeit aufzeigen konnten.

Die Abbildungen 5.4 und 5.5 veranschaulichen die Ergebnisse der Bruchlast- und Dehnungsmessung.

## 5.2.6 Organparameter

### 25-Hydroxycholecalciferol in den Organen

Der Nachweis von 25-Hydroxycholecalciferol in den Organen erfolgte durch die Laboratorien der DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel).

Die Ergebnisse mancher Gruppen, vornehmlich der Kontrollgruppe T1, lagen unter der Nachweisgrenze (LLQ). Um die gemessenen Werte der anderen Gruppen trotzdem statistisch auswerten zu können, wurde hypothetisch der gerade nicht mehr messbare Wert (auch nicht auf-

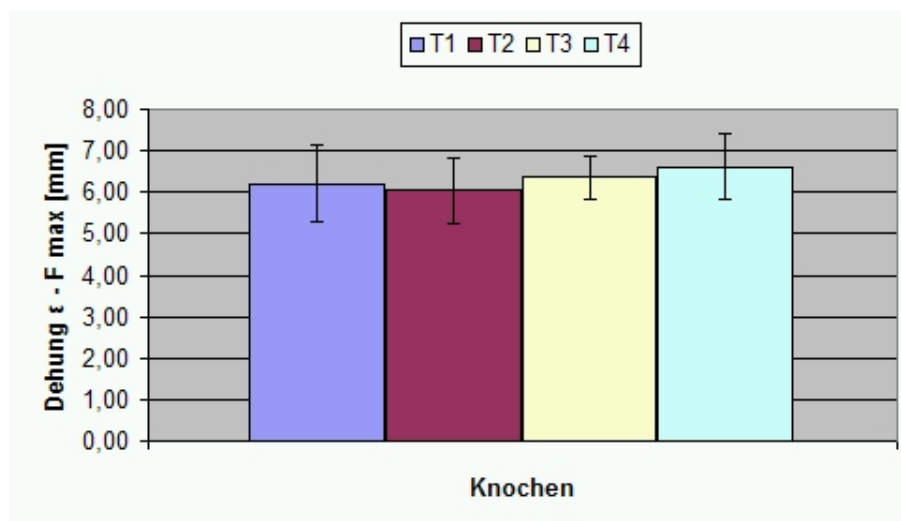


Abbildung 5.5: Durchschnittliche Dehugung der Knochen ( $MW \pm SD$ ) in den Versuchsgruppen bis zum Zeitpunkt des Brechens [T1: 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, T2: 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (10x)]

gerundet) als höchstmögliches Ergebnis herangezogen.

Vergleichbar den Ergebnissen der Plasma-Untersuchung erbrachte die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> einen dosisabhängigen Anstieg der 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentrationen in den verschiedenen Organen (siehe Abbildung 5.6). Dabei unterschieden sich jeweils die 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalte in den Gruppen T3 und T4 statistisch signifikant von der Kontrollgruppe T1. Auch die 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalte der Gruppe T2 lagen über denen der Gruppe T1, allerdings statistisch nicht signifikant, was auch an den hypothetisch maximal anzunehmenden LLQ-Werten für T1 liegen kann. Diese Werte sind in dieser Studie nur Annahmen, können jedoch in Wirklichkeit nicht messbar darunter liegen, sodass mit den tatsächlichen Werten eventuell statistisch signifikante Unterschiede festzustellen wären. Doch solange das Untersuchungsverfahren nicht weiter entwickelt ist, kann über diese Annahme nur spekuliert werden.

Die erhöhten 25(OH)D<sub>3</sub>-Werte der Organe machen deutlich, dass bei hohen Gaben von 25(OH)D<sub>3</sub> über einen längeren Zeitraum durchaus die Gefahr einer Kalzinose bestehen könnte. Die vermehrt aufgenommenen Mineralstoffe aus dem Darm können vom Organismus nicht mehr physiologisch adäquat verstoffwechselt werden, sondern werden in Weichgeweben eingelagert, was zu einer Verkalkung führt. Davon betroffen sind vor allem Gewebe der Aorta, des Herzens, der Nieren, der Sehnen und Bänder, des Uterus, des Darmes und der Magenschleimhaut (ALLEN und SHAH, 1992). Dies vorliegenden Fall, bei 10-facher Dosierung über sechs Wochen, ist dies nicht aufgetreten.

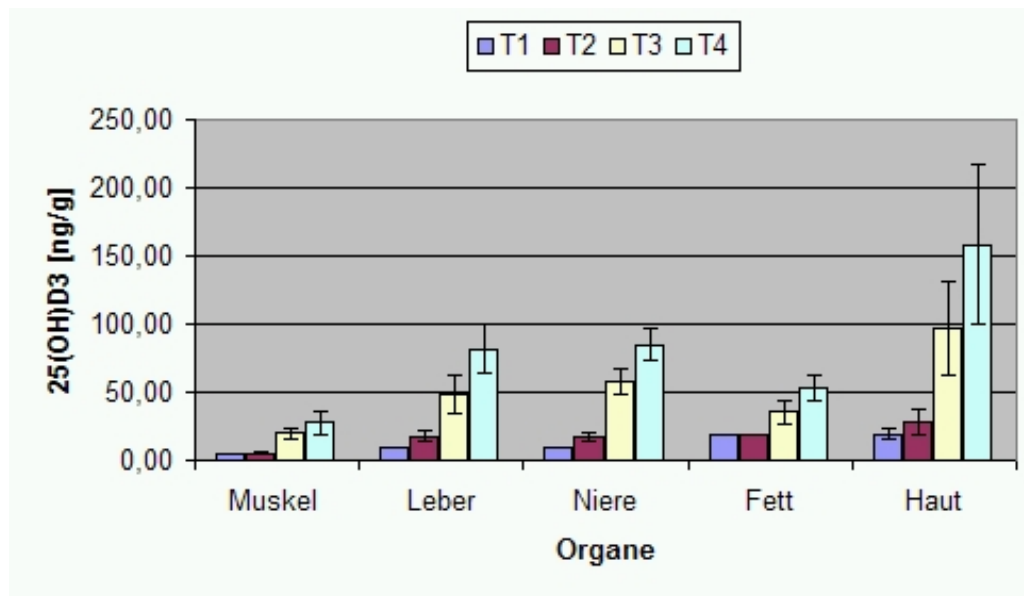


Abbildung 5.6: Durchschnittlicher 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Organe (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen [T1: 2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>, T2: 0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub> (10x)]

### Nierenparameter

Um den Einfluss der Wirksubstanzen auf die Niere beurteilen zu können, wurden die Parameter Trockensubstanz, Asche und Calcium bestimmt. Es wären pathologische Veränderungen in Folge der erhöhten Gabe von 25(OH)D<sub>3</sub> denkbar gewesen. Die vermehrt aufgenommenen Mineralstoffe aus dem Darm könnten vom Organismus nicht verstoffwechselt werden, sondern führten durch den Kompensationsmechanismus der Calciumeinlagerungen zu Weichteilverkalkungen (CASHMANN, 2007).

Die Nieren werden als eines der ersten Organe durch die Kalkablagerungen geschädigt, was zu einer verringerten glomerulären Filtrationsrate führt. Andererseits können die Nierentubuli den Urin nicht mehr effektiv konzentrieren, was vorübergehend zu einer Polyurie und einer sekundären Polydipsie führen kann. Beides führt zu einer funktionellen Niereninsuffizienz.

Bei Betrachtung der Werte für Trockensubstanz-, Asche- und Calciumgehalt der Nieren waren keine pathologischen Veränderungen oder Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen, die auf eine ursächliche Beziehung zu den verschiedenen Zusatzstoffen und Dosierungen schließen ließen. Die verabreichten Mengen der hohen 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosierung überschritten somit noch nicht die Stoffwechselkapazität des Körpers für das vermehrt resorbierte Calcium. Diese Schlussfolgerung wird durch die unauffälligen Befunde der Urinuntersuchung bestätigt.

### 5.2.7 Urinparameter

Bei der semiquantitativen Urinuntersuchung mittels Urinstick wiesen alle Tiere weder Glucose, noch Ketonkörper, noch Leukozyten auf. Blut im Urin wurde bei insgesamt 3 Tieren, zwei Tieren der Gruppe T1 (+ und ++) und ein Tier der Gruppe T4 (+), festgestellt. Nachdem bei einem dieser Tiere (Gruppe T1) auch geringe Mengen Nitrit nachgewiesen werden konnte und die Tiere keine weiteren Auffälligkeiten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass der Nachweis von Blut und Nitrit durch die Art der Urinentnahme zustande gekommen war.

14 der 24 untersuchten Tiere enthielten Spuren von Protein im Urin. Man geht heute davon aus, dass physiologisch kein Protein im Urin der Tiere sein darf. Ausnahmen von vorübergehend messbar erhöhten Proteinmengen im Urin stellen unter anderem starke körperliche Belastungen oder psychische Belastungen dar (KRAFT et al., 2005), was im vorliegenden Fall die kurz zuvor durchgeführten Euthanasien gewesen sein könnten.

Bilirubin und Urobilinogen waren, außer bei einem Tier, in allen untersuchten Proben negativ. Dieses Tier der Gruppe T4 hatte sowohl Bilirubin (+), als auch Urobilinogen(2) im Urin. Das Vorkommen von Bilirubin kann ebenfalls durch die Entnahme begründet sein.

Urobilinogen ist bei allen Haussäugetieren negativ oder schwach positiv (KRAFT et al., 2005) und hier, bestätigt durch das gute Allgemeinbefinden des Tieres, somit zu vernachlässigen.

Der Urin aller Tiere war sowohl makroskopisch, als auch in Bezug auf den pH-Wert und das spezifische Gewicht, ohne besonderen Befund. Es kann keine ursächliche Beziehung zwischen dem supplementierten Zusatzstoff, sowie dessen Dosierung, und den ermittelten Werten festgestellt werden.

Mikroskopisch wurden in allen Proben unterschiedliche Mengen an Verunreinigungen und Bakterien gefunden. Da die Cystocentese nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde und von einigen Tieren nur spontan abgesetzter Urin untersucht werden konnte, erklären sich diese Ergebnisse durch die Art und Weise der Urinentnahme.

In den Urinproben nahezu aller Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen, konnten unterschiedlich große und unterschiedlich viele Kristalle (Calciumoxalat-dihydrat- und Calciumoxalat-monohydrat-Kristalle) gefunden werden. Calciumoxalate werden im sauren Milieu gefunden und haben charakteristische Briefkuvertform (regelmäßig geformte Oktaeder). Calciumoxalate sind in geringen Mengen auch bei gesunden Tieren vorzufinden. Auf Grund der Tatsache, dass diese Kristalle bei Tieren aller Gruppen nachgewiesen werden konnten, und hinsichtlich der Größe und Menge kein Zusammenhang zum jeweiligen Zusatzstoff und dessen Dosierung herzustellen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die leichte Kristallbildung nicht auf eine Vitamin D-Übersorgung oder ein pathologisches Geschehen hindeuten.

Die Bildung von Harnsteinen (Urolithiasis) und damit verbundene Kristallurie wird durch ho-

he Dosierungen von Vitamin D oder Mineralstoffen begünstigt. Weitere wegbereitende Faktoren für die Entstehung einer Urolithiasis stellen eine zu geringe Wasseraufnahme und ein hoher, alkalischer Harn-pH-Wert dar. Diagnostisch sind sichtbare Harnsteine bei der makroskopischen Urinuntersuchung und Beläge oder Gries in der Harnblase von Bedeutung (SCHNURR-BUSCH und HEINRITZI, 2006). Auf keines der Versuchstiere traf eines der oben genannten Merkmale zu, weswegen hier von einer tolerierbaren Calciumoxalatmenge ausgegangen werden kann.

Der Urin-Kreatinin-Gehalt wird als fixe Bezugsgröße für andere Harnmessgrößen herangezogen, um dadurch besser quantitative und reproduzierbare Ergebnisse unterschiedlich konzentrierter Urine zu erzielen. Die dadurch gewonnenen Phosphor- und Calcium-Kreatinin-Quotienten unterlagen starken individuellen Schwankungen, welche durch die hohen Standardabweichungen ersichtlich wurden. Es wäre denkbar gewesen, dass durch die erhöhten Gaben von 25-Hydroxycholecalciferol auch mehr Calcium resorbiert und dadurch auch mehr Calcium über die Nieren ausgeschieden werden würden.

Auf Grund der stark differierenden Werte, und weil zudem kein ursächlicher Zusammenhang zum verabreichten Zusatzstoff, bzw. der verabreichten Dosierung zu erkennen ist, besitzen die ermittelten Werte keinen Einfluss auf das Untersuchungsziel der vorliegenden Studie.

### **5.2.8 Parameter des Kotes**

Die optischen Parameter des Kotes (Farbe, Konsistenz und eventuelle Beimengungen) wiesen, abgesehen vom Zeitraum der E.coli-Infektion, keine Auffälligkeiten in der Konsistenz und Farbe auf. Zu keiner Zeit waren Beimengungen wie Blut, Parasiten oder sonstige Fremdkörper im Kot zu finden.

Die durch die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Veterinärwissenschaftliches Departement der LMU München, vorgenommene parasitologische Kotuntersuchung, erbrachte den Befund vereinzelt auftretender Isospora-Oozyten bei den männlichen Tieren der Gruppen T2 und T4 und in nahezu allen Gruppen den Nachweis vereinzelter Balantidium-Zysten.

Die Bedeutung des Nachweises der Balantidium-Zysten wird in Kapitel 5.2.3 bereits ausführlich geschildert. Die Balantidium-Infektion spielt wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle in Bezug auf das pathologisch festgestellte, subklinische Durchfallgeschehen.

Oozysten von Kokzidien, zu denen auch Isospora suis zählt, sind bei der Kotuntersuchung

von Absetzferkeln ein häufiger Befund, der nur selten mit einer Enteritis in Verbindung steht. *Isospora suis* parasitiert in Epithelzellen des Dünndarms und ruft vor allem bei Saugferkeln zum Teil massive Durchfälle hervor (WALDMANN und PLONAIT, 2004).

Im vorliegenden Fall stellen die gefundenen Oozysten einen Nebenbefund dar und sind klinisch nicht von Bedeutung.

Im Falle eines massiven Parasitenbefalls sind die eosinophilen Granulozyten im Blutserum erhöht (KRAFT et al., 2005). Eine solche Eosinophilie lag bei den Versuchstieren nicht vor. Zudem zeigte keines der Tiere ein gestörtes Allgemeinbefinden oder Anzeichen eines klinischen Durchfallgeschehens.

Somit sind beide oben genannten parasitologischen Befunde nicht von klinischer Bedeutung und stehen zudem in keinem ursächlichen Zusammenhang zum verabreichten Zusatzstoff, bzw. zu dessen Dosierung.

### 5.2.9 Futterparameter

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Futtermitteluntersuchung fallen für die verschiedenen Parameter nur geringgradige Unterschiede zwischen den vier Versuchsfuttern auf.

Beim Vergleich mit den für eine Mischung aus Ferkelaufzuchtfutter I und II empfohlenen Mengen dieser Parameter (siehe KAMPHUES et al., 2009) fällt auf, dass der durchschnittliche Energiegehalt mit  $17,37 \text{ GE MJ/kg Futter} \pm 0,08$  über der Vorgabe von  $13,4 \text{ ME MJ/kg Futter}$  lag. Dies kommt durch die unterschiedlichen Angaben der Energieformen zustande. Bei der GE (gross energy) handelt es sich um den Bruttoenergiegehalt, der durch Verbrennung im Bombenkalorimeter bestimmt wird. Erst nach Abzug der Energieverluste durch Kot und Harn der Tiere erhält man die umsetzbare Energie ME (metabolizable energy), dessen Wert somit niedriger ist.

Der Rohfasergehalt von durchschnittlich  $3,87 \% \pm 0,13$  lag im geforderten Bereich von 3-6 %. Höhere Rohfasergehalte sollen in Kombination mit begrenzten Proteinmengen (max. 18 %) und einer restriktiven Fütterung zu Beginn der Absetzerfütterung *E.coli*-bedingte Verdauungsstörungen bzw. der Ödemkrankheit entgegenwirken (KAMPHUES et al., 2009). Die beschriebenen Maßnahmen waren im vorliegenden Versuch nicht ausreichend, weshalb es trotz verschiedener Vorsorgemaßnahmen zu einer *E.coli*-Infektion gekommen war. Die Rationen der verwendeten Versuchsfutter enthielten durchschnittlich  $18,00 \% \pm 0,10$  Rohprotein und waren somit hinsichtlich der *E.coli*-Prophylaxe in einem geeigneten Rahmen.



Laut KAMPHUES et al. (2009) sind mit durchschnittlich 7,88 g Calcium pro kg Futter  $\pm 0,34$  (gefordert 9 g Ca/kg Futter) zu geringe, und mit durchschnittlich 5,59 g Phosphor pro kg Futter  $\pm 0,23$  (gefordert 3-3,5 g P/kg Futter) zu hohe Gehalte dieser Mineralstoffe in den Versuchsfuttermitteln gewesen. Generell soll das Calcium-Phosphor-Verhältnis zwischen 1:1 und 2:1 liegen und war mit dem vorliegenden Verhältnis von 1,4:1 im Idealbereich.

### **Zusatzstoffe**

Von den verschiedenen Futtermischungen wurde der tatsächliche Gehalt des jeweiligen Zusatzstoffes pro kg Futter in den Laboratorien von DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel) bestimmt. Dabei fiel auf, dass der tatsächlich gemessene Gehalt der Zusatzstoffe etwas unter der erwarteten Menge lag, was durch Verluste während der Lagerung, infolge der Einwirkung von Licht und Sauerstoff (LEITZMANN et al., 2003), und durch die Messungenauigkeit verursacht sein kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Vitamin D<sub>3</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> in der Schweinefütterung äquivalent einzusetzen sind. Zu diesem Ergebnis kommen auch JAKOBSEN et al. (2007). Die gute Verträglichkeit von 25(OH)D<sub>3</sub> kann anhand der physiologischen Werte der verschiedenen Untersuchungsparameter deutlich gezeigt werden.

Die erwarteten und gefundenen hohen 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalte im Blutplasma und den verschiedenen Organen zeigen, dass beim Einsatz von 25(OH)D<sub>3</sub> darauf geachtet werden muss, dass vorgeschriebene und empfohlene Mengen nicht überschritten werden, da sonst bei einer länger andauernden Fütterung die Gefahr einer Kalzinose bestehen könnte.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen erhöhter Konzentrationen von 25-Hydroxycholecalciferol im Futter auf Verträglichkeit, Leistungsparameter, Gesundheit und mögliche Organverkalkungen von Absetzferkeln untersucht. Nach der bereits erfolgten Zulassung beim Geflügel soll nun der für die EU notwendige Unbedenklichkeitsnachweis von 25-Hydroxycholecalciferol an der Zieltierart Schwein, und hier speziell am Absetzferkel in einer Toleranzstudie erbracht werden. Diese ist Teil der durch die EFSA aufgestellten „Guidelines“ für die Durchführung des Zulassungsverfahrens neuer Futtermittelzusatzstoffe.

Die Untersuchung wurde als Fütterungsversuch über einen Zeitraum von sechs Wochen an 24 weiblichen und 24 männlich-kastrierten Absetzferkeln der Kreuzung Deutsche Landrasse x Large White x Piétrain durchgeführt, die randomisiert in die Kontrollgruppe (2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>), die einfach dosierte Versuchsgruppe (0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub>), die fünffach dosierte Versuchsgruppe (0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub>) und die zehnfach dosierte Versuchsgruppe (0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub>) mit jeweils 12 Tieren eingeteilt waren. Am Ende der Fütterungsperiode wurden alle Ferkel euthanasiert und im Anschluss einer pathologischen Untersuchung unterzogen.

Zur Bewertung möglicher Auswirkungen der unterschiedlichen 25-Hydroxycholecalciferolgehalte wurde in der pathologischen und histologischen Untersuchung auf Verkalkungen der Weichgewebe und Organe geachtet und der 25-Hydroxycholecalciferolgehalt im Blutplasma und in den verschiedenen Organen bestimmt. Um mögliche Auswirkungen der Testsubstanz auf den Knochenstoffwechsel beurteilen zu können, erfolgte post mortem die Bestimmung verschiedener Knochenparameter. Diese Parameter waren die Knochenbruchlast und -dehnung, der Knochenaschegehalt und dessen Gehalt an Calcium und Phosphor sowie die knochenspezifische alkalische Phosphatase im Blutserum. Ergänzt wurden diese Untersuchungen unter anderem durch allgemeine Leistungsparameter wie Körpermassezunahme, Futteraufnahme, Futterverwertung sowie verschiedene chemische und hämatologische Blutparameter und Untersuchungen von Urin-, Kot- und Futterproben.

Die pathologische Untersuchung zeigte auch bei der höchsten, der zehnfachen Dosierung von 25-Hydroxycholecalciferol keinerlei Veränderungen in den Weichgeweben und Organen der

Tiere, die einen Hinweis auf Verkalkungen gäben. Die erhöhten Vitamin D-Metabolitgehalte im Futter wurden gut vertragen, die Gewichtszunahme, die Futteraufnahme und die Futterverwertung unterschieden sich in den einzelnen Gruppen nicht voneinander. Wie zu erwarten war, erhöhten sich bei fünf- und zehnfacher Dosierung des Zusatzstoffes lediglich die 25-Hydroxycholecalciferolgehalte im Blutplasma sowie in den Organ- und Weichgeweben der Tiere statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

Keiner der erhobenen Untersuchungsparameter ergab Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Tiergesundheit, die mit der verabreichten fünf- bzw. zehnfachen Überdosierung von 25-Hydroxycholecalciferol in Zusammenhang stehen könnte.

## 7 Summary

**Andrea Erhardt**

### **Investigations on the tolerance of high concentrations of 25-hydroxycholecalciferol in weaning piglets**

The main objective of the present study is the evaluation of the effects of elevated concentrations of 25-hydroxycholecalciferol in the animal feed on tolerance, performance, health and potential organ calcification in weaning piglets. While 25-hydroxycholecalciferol is already registered as a feed additive in poultry, it is on its way for certification in the EU for the target species pig. A tolerance study is part of the „Guidelines“, compiled by the EFSA, for the process of licensing new additives for use in animal nutrition.

The investigation was conducted as a feeding experiment over a six week period. For the study, 24 female and 24 castrated male weaning piglets, a crossbreed of German Landrace x Large White x Piétrain were allotted to 4 experimental groups of 12 animals each. The experimental groups were: the control group (2000 I.E. Vitamin D<sub>3</sub>), the nominally dosed experimental group (0,05 mg 25(OH)D<sub>3</sub>), the fivefold dosed experimental group (0,25 mg 25(OH)D<sub>3</sub>) and the tenfold dosed experimental group (0,50 mg 25(OH)D<sub>3</sub>). At the end of the feeding period, all piglets were euthanized and subsequently subjected to a pathological examination.

In order to evaluate the possible impact of the different concentrations of 25-hydroxycholecalciferol, possible calcification of soft tissues and organs was checked during the pathological and histological examination. In addition, the concentration of 25-hydroxycholecalciferol in blood plasma and various organs was analysed. To evaluate possible effects on bone metabolism, a post mortem analysis of different bone parameters was made. These parameters include the bone breaking load and elasticity, the bone ash content and the

concentration of calcium and phosphorous plus the bone alkaline phosphatase in blood serum. These results were then completed by the investigation of performance parameters, such as weight gain, food intake, feed conversion as well as the analysis of chemical and haematological blood parameters and samples of urine, faeces and feed.

The pathological investigation showed no calcification of soft tissues and organs of any animals, even at the highest (tenfold) dose of 25-hydroxycholecalciferol. As expected, the concentration of 25-hydroxycholecalciferol in blood plasma, organ tissue and soft tissue is increased statistically significant.

None of the collected data shows an indication of a degradation or impairment of animal health, which can be associated with the 25-hydroxycholecalciferol concentrations used in the study.

# Literaturverzeichnis

- ALLEN S. und SHAH J. (1992) *Calcinosis and metastatic calcification due to vitamin D intoxication. A case report and review.* Horm Res **37**: 68–77.
- ALLEN W.M. und DAVIS D.C. (1981) *Milk fever, hypomagnesaemia and the „downer cow“ syndrome.* Br Vet J **137**: 435–441.
- ALPERT P. und SHAIKH U. (2007) *The effect of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems.* Biol Res Nurs **9**: 117–129.
- AMLING M., PRIEMEL M., HOLZMANN T., CHAPIN K., RUEGER J., BARON R. und M.B. DEMAY M. (1999) *Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses.* Endocrinology **140**: 4982–4987.
- AMTSBERG G. und MERKT M. (1986) *Schweinedysenterie: Pathogenese, Epidemiologie und Nachweis.* Prakt Tierarzt **67**: 584–591.
- ATENICO A., EDWARDS H. und PESTI G. (2005a) *Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler breeder hen diets on the performance and bone abnormalities of the progeny fed diets containing various levels of calcium or 25-hydroxycholecalciferol.* Poult Sci **84**: 1593–1603.
- ATENICO A., PESTI G. und EDWARDS H. (2005b) *Twenty-five hydroxycholecalciferol as a cholecalciferol substitute in broiler breeder hen diets and its effect on the performance and general health of the progeny.* Poult Sci **84**: 1277–1285.
- AVIOLI L. (1999) *Vitamin D and the D-hormones, alfacalcidol and calcitriol, as therapeutic agents for osteoporotic populations.* Calcif Tissue Int **65**: 292–294.
- AVIOLI L., LEE S., McDONALD J., LUND J. und DELUCA H. (1967) *Metabolism of vitamin D<sub>3</sub>-3H in human subjects: distribution in blood, bile, feces, and urine.* J Clin Invest **46**: 983–992.

- BAR A., RAZAPHKOVSKY V., VAX E. und PLAVNIK I. (2003) *Performance and bone development in broiler chickens given 25-hydroxycholecalciferol*. Br Poult Sci **44**: 224–233.
- BAR A., SACHS M. und PERLMAN R. (1986) *Use of 1alpha-hydroxyvitamin D3 to prevent bovine parturient paresis. VI. concentrations of vitamin D metabolites and vitamin D3 equivalence in milk*. J Dairy Sci **69**: 2810–2814.
- BARGER-LUX M., HEANEY R., LANSPA S., HEALY J. und DELUCA H. (1995) *An investigation of sources of variation in calcium absorption efficiency*. J Clin Endocrinol Metab **80**: 406–411.
- BARNETT B., JONES G., CHO C. und SLINGER S. (1982) *The biological activity of 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol for rainbow trout (salmo gairdneri)*. J Nutr **112**: 2020–2026.
- BELL N., EPSTEIN S., SHARY J., GREENE V., OEXMANN M. und SHAW S. (1988) *Evidence of a probable role for 25-hydroxyvitamin D in the regulation of human calcium metabolism*. J Bone Miner Res **3**: 489–495.
- BHATTACHARYYA M. und DELUCA H. (1974) *Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase*. Arch Biochem Biophys **160**: 58–62.
- BIKLE D., GEE E., HALLORAN B., KOWALSKI M., RYZEN E. und HADDAD J. (1986) *Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein*. J Clin Endocrinol Metab **63**: 954–959.
- BINDERMAN I. und SÖMJEN D. (1984) *24,25-dihydroxycholecalciferol induces the growth of chick cartilage in vitro*. Endocrinology **115**: 430–432.
- BISCHOFF-FERRARI H., GIOVANNUCCI E., WILLETT W., DIETRICH T. und DAWSON-HUGHES B. (2006) *Erratum in: Am J Clin Nutr. 2006 Nov;84(5):1253. dosage error in abstract. Am J Clin Nutr. 2007 Sep;86(3):809. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. Am J Clin Nutr 84: 18–28. Erratum, Am J Clin Nutr. 2006 Nov;84(5):1253, Am J Clin Nutr. 2007 Sep;86(3):809.*
- BLAIR R., BURTON B., DOIGE C., HALSTEAD A. und NEWSOME F. (1989) *Tolerance of weanling pigs for dietary vitamin A and D*. Int J Vitam Nutr Res **59**: 329–332.
- BLANK S., SCANLON K., SINKS T., LETT S. und FALK H. (1995) *An outbreak of hypervitaminosis D associated with the overfortification of milk from a home-delivery dairy*. Am J Public Health **85**: 656–659.

- BLOMSTRAND R. und FORSGREN L. (1967) *Intestinal absorption and esterification of vitamin D<sub>3</sub>-1,2-<sup>3</sup>H in man*. Acta Chem Scand **21**: 1662–1663.
- BLUM J., HORST R. und DÖCKE F. (1994) Nebenschilddrüse, Calcitonin und Vitamin-D-Hormon, In: F. DÖCKE (Hrsg.), Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage, 269-308. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- BLUNT J., DELUCA H. und SCHNOES H. (1968a) *25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D<sub>3</sub>*. Biochemistry **7**: 3317–3322.
- BLUNT J., TANAKA Y. und DELUCA H. (1968b) *The biological activity of 25-hydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D<sub>3</sub>*. Proc Natl Acad Sci U S A **61**: 1503–1506.
- BOUILLON R., CROMPHAUT S.V. und CARMELIET G. (2003) *Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms*. J Cell Biochem **88**: 332–339.
- BRABANT G. (2006) Therapie endokrinologischer Erkrankungen, In: J.C. Frölich und W. Kirch (Hrsg.), Praktische Arzneitherapie, 4. Auflage, 399-498. Springer-Verlag, Berlin.
- BRINGHURST F., DEMAY M. und KRONENBERG H. (1998) Williams Textbook of Endocrinology, J.D. Wilson, D.W. Foster, H.M. Kronenberg, P.D. Larsen (Hrsg.), 1155-1209. Verlag Saunders, Philadelphia, USA.
- BRONNER F. (2003) *Mechanisms of intestinal calcium absorption*. J Cell Biochem **88**: 387–393.
- BRONNER F. und PANSU D. (1999) *Nutritional aspects of calcium absorption*. J Nutr **129**: 9–12.
- BRONNER F., PANSU D. und STEIN W. (1986) *An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine*. Am J Physiol **250**: 561–569.
- BROWN E. (1991) *Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messengers*. Physiol Rev **71**: 371–411.
- BUKOVSKY C. und ESTERMANN A. (2007) *Lahmheiten bei Mastschweinen*. Die Grüne **4**: 36–37.
- BURCK H.C. (1988) Histologische Technik, 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- CANTORNA M., HAYES C. und DELUCA H. (1996) *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 7861–7864.



- CASHMANN K. (2007) *Calcium and vitamin D*. Novartis Found Symp **282**: 123–142.
- CHARLES O., DUKE S. und REDDY B. (1978) *Further studies on the response of laying hens to 25 hydroxycholecalciferol*. Poult Sci **57**: 1098–1099.
- CHARLES O. und ERNST R. (1973) *Effect of age, calcium levels, and vitamin D metabolites on egg shell quality of SCWL*. Poult Sci **52**: 1908.
- CHAVEZ L., SERDA R., CHOE S., DAVIDI L. und HARMEYER J.O.J. (2003) *Molecular basis for pseudo vitamin D-deficiency rickets in the Hannover pig*. J Nutr Biochem **14**: 378–385.
- CHEN T., SCHWARTZ G., BURNSTEIN K., LOKESHWAR B. und HOLICK M. (2000) *The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D3 and 19-nor-1alpha,25-dihydroxyvitamin D2 as therapeutic agents for prostate cancer*. Clin Cancer Res **6**: 901–908.
- CHICK D. (1976) *Study of rickets in vienna 1919-1922*. Med Hist **20**: 41–51.
- CHINEME C., KROOK L. und POND W. (1976) *Bone pathology in hypervitaminosis D - An experimental study in young pigs*. Cornell Vet **66**: 387–412.
- CHRISTAKOS S., BARLETTA F., HUENING M., DHAWAN P., LIU Y., PORTA A. und PENG X. (2003) *Vitamin D target proteins: function and regulation*. J Cell Biochem **88**: 238–244.
- CHRISTAKOS S., GILL R., LEE S. und LI H. (1992) *Molecular aspects of the calbindins*. J Nutr **122**: 678–682.
- CLEMENTS M., DAVIES M., HAYES M., HICKEY C., LUMB G., MAWER E. und ADAMS P. (1992) *The role of 1,25-dihydroxyvitamin D in the mechanism of acquired vitamin D deficiency*. Clin Endocrinol (Oxf) **37**: 17–27.
- COATES M. und HOLDSWORTH E. (1961) *Vitamin D<sub>3</sub> and absorption calcium in the chick*. Br J Nutr **15**: 131–147.
- COHEN A., BAR A., EISNER U. und HURWITZ S. (1978) *Calcium absorption, calcium-binding protein, and egg shell quality in laying hens fed hydroxylated vitamin D derivatives*. Poult Sci **57**: 1646–1651.
- COMPSTON J., MERRETT A., HAMMETT F. und MAGILL P. (1981) *Comparison of the appearance of radiolabelled vitamin D3 and 25-hydroxy-vitamin D3 in the chylomicron fraction of plasma after oral administration in man*. Clin Sci (Lond) **60**: 241–243.

- CRAVISO G., GARRETT K. und CLEMENS T. (1987) *1,25-dihydroxyvitamin D3 induces the synthesis of vitamin D-dependent calcium-binding protein in cultured chick kidney cells.* Endocrinology **120**: 894–902.
- DAVIES M., MAWER E. und KRAWITT E. (1980) *Comparative absorption of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in intestinal disease.* Gut **21**: 287–292.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R., HOLICK M., LIPS P., MEUNIER P. und R.VIETH (2005) *Estimates of optimal vitamin D status.* Osteoporos Int **16**: 713–716.
- DELMAS P. (1991) *Biochemical markers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis.* Am J Med **91**: 59S–63S.
- DELUCA H. (1967) *Mechanism of action and metabolic fate of vitamin D.* Vitam Horm **25**: 315–367.
- DELUCA H. (1974) *Vitamin D: the vitamin and the hormone.* Fed Proc **33**: 2211–2219.
- DELUCA H. (1981) *The vitamin D system: a view from basic science to the clinic.* Clin Biochem **14**: 213–222.
- DELUCA H. (2004) *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.* Am J Clin Nutr **80**: 1689S–1696S.
- DELUCA H., KRISINGER J. und DARWISH H. (1990) *The vitamin D system.* Kidney Int **38**: 2–8.
- DELUCA H., LUND J., ROSENBLOOM A. und LOBECK C. (1967) *Metabolism of tritiated vitamin D3 in familial vitamin D-resistant rickets with hypophosphatemia.* J Pediatr **70**: 828–832.
- DRESCHER D., DELUCA H. und IMRIE M. (1969) *On the site of discrimination of chicks against vitamin D.* Arch Biochem Biophys **130**: 657–661.
- DSM N.P. (2008a) *Hy•D® advanced vitamin D for poultry.* www.dsm.com.
- DSM N.P. (2008b) *Hy•D® for layers and breeders.* www.dsm.com.
- DUSSO A., BROWN A. und SLATOPOLSKY E. (2005) *Vitamin D.* Am J Physiol Renal Physiol **289**: F8–F28.
- EFSA (2005) *Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Zusatzstoffe, Erzeugnisse und Stoffe der Tierernährung auf Ersuchen der Kommission über die Beurteilung der Sicherheit*

und Wirksamkeit von „Hy•D®“ (Calcifediol) auf der Basis von 25-Hydroxycholecalciferol/25-Hydroxy-Prächolecalciferol als Futterzusatzstoff entsprechend der Richtlinie 70/524/EWG des Rates. [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu).

- ENDO K., KATSUMATA K., HIRATA M., MASAKI T., KUBODERA N., NAKAMURA T., IKEDA K. und OGATA E. (2000) *1,25-dihydroxyvitamin D3 as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcemic rats with continuous parathyroid hormone-related peptide infusion*. J Bone Miner Res **15**: 175–181.
- EPSTEIN S. (1988) *Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover*. Endocr Rev **9**: 437–449.
- ERBEN R., SCUTT A., MIAO D., KOLLENKIRCHEN U. und HABEREY M. (1997) *Short-term treatment of rats with high dose 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow*. Endocrinology **138**: 4629–4635.
- FISCHER J. und BLUM J. (1980) *Non-calcium regulated parathyroid hormone secretion*. Miner Electrolyte Metab **3**: 158–166.
- FRANK F. (1977) *Potential uses of the vitamin D<sub>3</sub> metabolite, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, in the animal industry*. Proceedings Distributors Feed Research Council **32**: 14–22.
- FRANK F., OGILVIE M., KOSHY K., KAKUK T. und JORGENSEN N. (1977) Parturient paresis prophylaxis with 25-hydroxycholecalciferol, In: A. W. Norman, K. Schäfer und J. W. Coburn (Hrsg.), Vitamin D. Biochemical, Chemical and Clinical Aspects Related to Calcium Metabolism. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- FRASER D. (1995) *Vitamin D*. Lancet **345**: 104–107.
- FRASER D. und KODICEK E. (1970) *Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite*. Nature **228**: 764–766.
- FRITTS C. und WALDROUP P. (2001) *Comparison of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in diets for broiler chickens*. 8 Symposium "Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier".
- FUNK C. (1912) *The etiology of the deficiency diseases: Beriberi, Polyneuritis in birds, Scurvy, Pellagra*. J State Med **20**: 341–368.
- GAST D., MARQUART J., JORGENSEN N. und DELUCA H. (1977) *Efficacy and safety of 1alpha-hydroxyvitamin D3 for prevention of parturient paresis*. J Dairy Sci **60**: 1910–1920.

- GREIG A. (1963) *Hypervitaminosis in cattle*. XVII. Welt-Tierärztekongreß Hannover, volume 1, 233–234.
- GRIFFIN M. und KUMAR R. (2003) *Effects of 1alpha,25(OH)2D3 and its analogs on dendritic cell function*. J Cell Biochem **88**: 323–326.
- GÜRTLER H., SEIDEL H. und LIEBAUG E. (1977) *Prophylaxe der Gebärfähigkeit der Milchkuh durch Verabreichung hoher Dosen Vitamin D3*. Monatsh Veterinärmed **32**: 664–668.
- GUO Q., CHRISTAKOS S., ROBINSON N. und MATTSON M. (1998) *Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 3227–3232.
- GUTZWILLER A., STOLL P. und D.GUGGISBERG (2007) *Phosphorzufuhr und Beinschwäche bei wachsenden Schweinen*. Agrarforschung **14**: 312–317.
- HADDAD J. und WALGATE J. (1976) *25-hydroxyvitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifidiol-binding protein*. J Biol Chem **251**: 4803–4809.
- HANCHETTE C. und SCHWARTZ G. (1992) *Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation*. Cancer **70**: 2861–2869.
- HARRISON J., HITCHMAN A. und BROWN R. (1975) *Intestinal calcium-binding protein in animals fed normal and rachitogenic diets: II. pig studies*. Can J Physiol Pharmacol **53**: 144–149.
- HASCHEK W., KROOK L., KALLFELZ F. und POND W. (1978) *Vitamin D toxicity. Initial site and mode of action*. Cornell Vet **68**: 324–364.
- HAUSSLER M. und RASMUSSEN H. (1972) *The metabolism of vitamin D3 in the chick*. J Biol Chem **247**: 2328–2335.
- HAUSSLER M., TERPENING C., KOMM B., WHITEFIELD G. und HAUSSLER C. (1988) *Vitamin D hormone receptors: structure, regulation and molecular function*. Vitamin D: molecular, cellular, and clinical endocrinology: Proceedings of the 7th Workshop on Vitamin D, 205–213. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- HAUSSLER M., ZERWEKH J., HESSE R., RIZZARDO E. und PECHET M. (1973) *Biological activity of 1alpha-hydroxycholecalciferol, a synthetic analog of the hormonal form of vitamin D3*. Proc Natl Acad Sci U S A **70**: 2248–52.
- HEANEY R., BARGER-LUX M., DOWELL M., CHEN T. und HOLICK M. (1997) *Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites*. J Clin Endocrinol Metab **82**: 4111–4116.

- HEIM G., WEISER H. und RAMBECK W. (1990) *Einflüsse verschiedener Vitamin-D-Metaboliten auf das Beinschwäche-Syndrom bei Mastputen*. Z Ernährungswiss **29**: 178–183.
- HEINRITZI K. (1987) *Der klinische Fall: Magenulkus*. Tierarztl Prax **15**: 349, 441–445.
- HEINRITZI K. (2006a) Gliedmaßen- und Skeletterkrankungen, In: K. Heinritzi, H.R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.), *Schweinekrankheiten*, 1. Auflage, 74-88. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- HEINRITZI K. (2006b) Krankheiten des Verdauungstraktes, In: K. Heinritzi, H.R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.), *Schweinekrankheiten*, 1. Auflage, 74-88. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- HEINRITZI K. (2006c) Laboruntersuchung, In: K. Heinritzi, H.R. Gindele, G. Reiner, U. Schnurrbusch (Hrsg.), *Schweinekrankheiten*, 1. Auflage, 35-40. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- HEINRITZI K. (2006d) *Richtiges Vorgehen bei Verdacht auf Futterschädlichkeit*. Aft - Herbstsymposium. Gesunde Schweine - sichere Lebensmittel.
- HEINRITZI K., HÄNICHEN T., RAMBECK W. und HERMANNNS W. (2000) *Vitamin D3-Intoxikation-Fallbericht*. Dsch Tierarztl Wochenschr **107**: 477–480.
- HEINRITZI K. und PLONAIT H. (2004) Blutkrankheiten, In: K.-H. Waldmann und M. Wendt (Hrsg.), *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, 4. Auflage, 169-196. Parey-Verlag, Stuttgart.
- HENRY H. und NORMAN A. (1978) *Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability*. Science **201**: 835–837.
- HERMANNNS W., LIEBIG K. und SCHULZ L.C. (1981) *Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritits using plastic embedded whole joints*. Histochemistry **73**: 439–446.
- HERSHBERGER P., YU W., MODZELEWSKI R., RUEGER R., JOHNSON C. und TRUMP D. (2001) *Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis*. Clin Cancer Res **7**: 1043–1051.
- HÜLSMANN H., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., GANTER M. und MÜLLER E. (1991) *Klinische Befunde bei der Vitamin-D-Intoxikation des Schweines*. Tierarztl Prax **19**: 488–492.
- HÄNI H. und HÖRNING B. (1974) *Zur Balantidiose des Schweines*. Schweiz Arch Tierheilkd **116**: 303–306.

- HÄNI H., THOMAS J. und SCHÄFER H. (1975) *Zur Calcinose des Jungferkels*. Schweiz Arch Tierheilkd **117**: 9–18.
- HOCK J. und FONSECA J. (1990) *Anabolic effect of human synthetic parathyroid hormone-(1-34) depends on growth hormone*. Endocrinology **127**: 1804–1810.
- HOENDEROP J., KEMP A.V.D., HARTOG A., GRAAF S.V.D., OS C., WILLEMS P. und BINDELS R. (1999) *Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia*. J Biol Chem **274**: 8375–8378.
- HOLICK M. (2002) *Vitamin D: the underappreciated D- hormone that is important for skeletal and cellular health*. Curr Opin Endocrinol Diabetes **9**: 87–98.
- HOLICK M. (2005) *The vitamin D epidemic and its health consequences*. J Nutr **135**: 2739S–2748S.
- HOLICK M. (2006) *High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health*. Mayo Clin Proc **81**: 353–373.
- HOLICK M. (2007) *Vitamin D deficiency*. N Engl J Med **357**: 266–281.
- HOLICK M., SCHNOES H., DELUCA H., SUDA T. und COUSINS R. (1971) *Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine*. Biochemistry **10**: 2799–2804.
- HOLICK M., TIAN X. und ALLEN M. (1995) *Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D<sub>3</sub> in the skin of poikilothermic animals*. Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 3124–3126.
- HOPKINS F. (1912) *Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietary*. J Physiol **44**: 425–460.
- HULDSCHINSKY K. (1919) *Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne*. Dtsch Med Wochenschr **45**: 712–713.
- HYPPÖNEN E., LÄÄRÄ E., REUNANEN A., JÄRVELIN M. und VIRTANEN S. (2001) *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study*. Lancet **358**: 1500–1503.
- IKEZAKI S., NISHIKAWA A., FURUKAWA F., TANAKAMARU Z., NAKAMURA H., MORI H. und HIROSE M. (1999) *Influences of long-term administration of 24R, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, a vitamin D<sub>3</sub> derivative, in rats*. J Toxicol Sci **24**: 133–139.

- JACOBUS C., HOLICK M., SHAO Q., CHEN T., HOLM I., KOLODNY J., FULEIHAN G. und SEELY E. (1992) *Hypervitaminosis D associated with drinking milk*. N Engl J Med **326**: 1173–1177.
- JAKOBSEN J., MARIBO H., BYSTED A., SOMMER H. und HELS O. (2007) *25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> affects vitamin D status similar to vitamin D<sub>3</sub> in pigs - but the meat produced has a lower content of vitamin D*. Br J Nutr **98**: 908–913.
- JANSSEN W., VESTEEGH H. und VAN SCHAGEN P. (1981) *Influence of stabilized 25-hydroxycholecalciferol on the performance of laying hens and on the egg shell quality*. Arch Geflügelkd **45**: 194–200.
- JEFFRIES D., FARQUHARSON C., THOMSON J., SMITH W., SEAWRIGHT E., McCORMARCK H. und WHITEHEAD C. (2002) *Differences in metabolic parameters and gene expression related to osteochondrosis/osteoarthritis in pigs fed 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>*. Vet Res **33**: 383–396.
- JOHNSON C., HERSHBERGER P. und TRUMP D. (2002) *Vitamin D-related therapies in prostate cancer*. Cancer Metastasis Rev **21**: 147–158.
- JOLLY S., HENDERSON R., FRAMPTON C. und EASON C. (1995) *Cholecalciferol toxicity and its enhancement by calcium carbonate in the common brushtail possum*. Wildl Res **22**: 579–583.
- JONES G., STRUGNELL S. und DELUCA H. (1998) *Current understanding of the molecular actions of vitamin D*. Physiol Rev **78**: 1193–1231.
- JONSSON G. und PEHRSON B. (1970) *Trials with prophylactic treatment of parturient paresis*. Vet Rec **87**: 575–578.
- KAETZEL D.J. und SOARES J.J. (1979) *Effects of cholecalciferol steroids on bone and egg shell calcification in Japanese quail*. J Nutr **109**: 1601–1608.
- KAMPHUES J., COENEN M., IBEN C., KIENZLE E., PALLAUF J., SIMOM O., WANNER M. und ZENTEK J. (2009) *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen der Tierernährung*, 11. Auflage, 112-269. M. & H. Schaper Verlag, Hannover.
- KANIS J., DREZNER M., EVANS D., HORST R., MALLUCHE H., NORMAN A., THAVARAJAH M. und USKOKOVIC M. (1988) *Vitamin D. Molecular, cellular and clinical endocrinology*. Chapter Prospects for the modelling of vitamin D activity in man, 739–748. Walter de Gruyter, Berlin - New York.

- KAUNE R. und HARMEYER J. (1987) *Eine erbliche Störung des Vitamin-D-Stoffwechsels beim Schwein. Die Pseudo-Vitamin-D-Mangelrachitis, Typ I.* Berl Munch Tierarztl Wochenschr **100**: 6–13.
- KESHAVARZ K. (2003) *A comparison between cholecalciferol and 25-OH-cholecalciferol on performance and eggshell quality of hens fed different levels of calcium and phosphorus.* Poult Sci **82**: 1415–1422.
- KLUGE H., BROZ J., FISCHER M., BUCHWALD K. und EDER K. (2006) *Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Vitamin D<sub>3</sub> und 25-Hydroxycholecalciferol auf Leistung, Knochenentwicklung und Blutparameter bei Absetzferkel.* 9 Tagung Schweine- und Geflügeler-nährung, Universität Halle-Wittenberg .
- KÖNIG T. (2004) *Entwicklung der Ernährungsforschung beim Schwein (bis 1930).* Diss. med. vet., Tierärztl. Hochschule Hannover.
- KOLB E. (1998) *Verwertung und Anwendung von Vitamine bei Haustieren.* Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen.
- KOSHIZUKA K., KOIKE M., SAID J., BINDERUP L. und KOEFFLER H. (1998) *Novel vitamin D<sub>3</sub> analog (CB1093) when combined with paclitaxel and cisplatin inhibit growth of MCF-7 human breast cancer cells in vivo.* Int J Oncol **13**: 421–428.
- KRAFT W., DÜRR U.M., FÜRL M., BOSTEDT H. und HEINRITZI K. (2005) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 6. Auflage. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
- KRAWITT E. und CHASTENAY B. (1980) *25-hydroxy vitamin D absorption test in patients with gastrointestinal disorders.* Calcif Tissue Int **32**: 183–187.
- LAHRMANN K. und PLONAIT H. (2004) *Gliedmaßen- und Skeletterkrankungen*, In: K.-H. Waldmann, M. Wendt (Hrsg.), *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, 4. Auflage, 261-306. Parey-Verlag, Stuttgart.
- LAWSON D., FRASER D., KODICEK E., MORRIS H. und WILLIAMS D. (1971) *Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism.* Nature **239**: 228–230.
- LEDWABA M. und ROBERSON K. (2003) *Effectiveness of twenty-five-hydroxycholecalciferol in the prevention of tibial dyschondroplasia in Ross cockerels depends on dietary calcium level.* Poult Sci **82**: 1769–1777.



- LEITZMANN C., MÜLLER C., MICHEL P., BREHME U., HAHN A. und LAUBE H. (2003) Physiologische Grundlagen der Ernährung - Vitamine, In: C. Leitzmann, C. Müller, P. Michel, U. Brehme, A. Hahn und H. Laube (Hrsg.), Ernährung in Prävention und Therapie: Ein Lehrbuch, 2. Auflage, S. 28-55. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- LEMIRE J. und ARCHER D. (1991) *1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest **87**: 1103–1107.
- LEMIRE J., ARCHER D., BECK L. und SPIEGELBERG H. (1995) *Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions*. J Nutr **125**: 1704S–1708S.
- LÖFFLER G. und BRINGELIUS-FLOHÉ R. (2007) Vitamine, In: G. Löffler, P. E. Petrides, P.C. Heinrich (Hrsg.), Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, 679-714. Springer-Verlag, Berlin.
- LI Y. (2003) *Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system*. J Cell Biochem **88**: 327–331.
- LIESEGANG A., BÜRGI E., SASSI M., RISTELI J. und WANNDER M. (2002) *Influence of a vegetarian diet versus a diet with fishmeal on bone in growing pigs*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **49**: 230–238.
- LITTLEDIKE E.T. und HORST R.L. (1982) *Vitamin D3 toxicity in dairy cows*. J Dairy Sci **65**: 749–59.
- LONG G. (1984) *Acute toxicosis in swine associated with excessive dietary intake of vitamin D*. J Am Vet Med Assoc **184**: 164–169.
- LUND J. und DELUCA H. (1966) *Biologically active metabolite of vitamin D3 from bone, liver, and blood serum*. J Lipid Res **7**: 739–744.
- MACLAUGHLIN J. und HOLICK M. (1985) *Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3*. J Clin Invest **76**: 1536–1538.
- MAISLOS M., SILVER J. und FAINARU M. (1981) *Intestinal absorption of vitamin D sterols: differential absorption into lymph and portal blood in the rat*. Gastroenterology **80**: 1528–1534.
- MALABANAN A., VERONIKIS I. und HOLICK M. (1998) *Redefining vitamin D insufficiency*. Lancet **351**: 805–806.
- MANOLAGAS S. und DEFTOS L. (1981) *Comparison of 1,25-, 25-, and 24,25-hydroxylated vitamin D3 binding in fetal rat calvariae and osteogenic sarcoma cells*. Calcif Tissue Int **33**: 655–661.

- MANOLAGAS S., PROWEDINI D. und TSOUKAS C. (1985) *Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the immune system*. Mol Cell Endocrinol **43**: 113–122.
- MARKOWITZ M., GUNDBERG C. und ROSEN J. (1987) *The circadian rhythm of serum osteocalcin concentrations: effects of 1,25 dihydroxyvitamin D administration*. Calcif Tissue Int **40**: 179–183.
- MARRET L., FRANK F. und ZIMBELMAN R. (1975) *25-hydroxycholecalciferol as a dietary replacement of D3 to improve egg shell calcification*. Poult Sci **54**: 1788 (Abstr.).
- MARTIN D. und DELUCA H. (1969) *Influence of sodium on calcium transport by the rat small intestine*. Am J Physiol **216**: 1351–1359.
- MARTIN T. (1993) *Hormones in the coupling of bone resorption and formation*. Osteoporos Int **3**: 121–125.
- MAWER E., BACKHOUSE J., HOLMAN C., LUMB G. und STANBURY S. (1972) *The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues*. Clin Sci **43**: 413–431.
- MAY E., ASADULLAH K. und ZÜGEL U. (2004) *Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy **3**: 377–393.
- McCOLLUM E. (1957) A history of nutrition. The sequences of ideals in nutrition investigation. Verlag Houghthon Mifflin Company, Boston.
- McCOLLUM E. und DAVIS M. (1913) *The necessity of certain lipins in the diet during growth*. J Biol Chem **15**: 167–175.
- McCOLLUM E., SIMMONDS N. und BECKER J. (1922) *Studies on experimental rickets*. J Biol Chem **53**: 293–312.
- McLOUGHLIN C. und SOARES J.J. (1976) *A study on the effects of 25-hydroxycholecalciferol and calcium source on egg shell quality*. Poult Sci **55**: 1400–1410.
- MELLANBY E. (1919) *An experimental investigation on rickets*. Lancet **1**: 407–412.
- MERK B. (1992) Einfluß von Alter, Rasse, Haltung, Fütterung und Fortpflanzungsstadium auf Serumenzymwerte beim Schwein. Diss. med. vet., Tierärztl. Fakultät der LMU, München.
- MERKE J., KLAUS G., HÜGEL U., WALDHERR R. und RITZ E. (1986) *No 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors on osteoclasts of calcium-deficient chicken despite demonstrable receptors on circulating monocytes*. J Clin Invest **77**: 312–314.

- MERLINO L., CURTIS J., MIKULS T., CERHAN J., CRISWELL L., SAAG K. und STUDY I.W.H. (2004) *Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study*. *Arthritis Rheum* **50**: 72–77.
- MINGHETTI P. und NORMAN A. (1988) *1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> receptors: gene regulation and genetic circuitry*. *FASEB J* **2**: 3043–3053.
- MIRAVET L., REDEL J., CARRE M., QUEILLÉ M. und BORDIER P. (1976) *The biological activity of synthetic 25,26-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol in vitamin D-deficient rats*. *Calcif Tissue Res* **21**: 145–152.
- MORII H. und DELUCA H. (1967) *Relationship between vitamin D deficiency, thyrocalcitonin, and parathyroid hormone*. *Am J Physiol* **213**: 358–362.
- MORRISEY R., COHN R., EMPSON R., GREENE H., TAUNTON O. und ZIPORIN Z. (1977) *Relative toxicity and metabolic effects of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in chicks*. *J Nutr* **107**: 1027–1034.
- MOSDOL G. und SKEIE A. (1978) *The prophylactic use of vitamin D<sub>3</sub> in parturient paresis in the cow in a practice district in eastern Norway. A retrospective investigation*. *Nord Vet Med* **30**: 83–9.
- MOSS D. (1987) *Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes*. *Clin Biochem* **2**: 225–230.
- MUFF R., FISCHER J., BIBER J. und MURER H. (1992) *Parathyroid hormone receptors and intracellular mediators in control of proximal tubular function*. *J Endocrinol Invest* **15**: 143.
- MUNGER K., ZHANG S., O'REILLY E., HERNAN M., OLEK M., WILLETT W. und ASCHERIO A. (2004) *Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis*. *Neurology* **62**: 60–65.
- MYRTLE J. und NORMAN A. (1971) *Vitamin D: A cholecalciferol metabolite highly active in promoting intestinal calcium transport*. *Science* **171**: 79–82.
- NAKAMURA T., KUROKAWA T. und ORIMO H. (1987) *Action of 24R, 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (24,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) on bone in vivo*. *In Vivo* **1**: 313–317.
- NECHAMA H., NOFF D., HARELL A. und EDELSTEIN S. (1977) *The intestinal absorption of vitamin D and its metabolites*. *J Mol Med* **2**: 413–422.
- NEMERE I. und NORMAN A. (1988) *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated vesicular transport of calcium in intestine: time-course studies*. *Endocrinology* **122**: 2962–2969.

- NIJWEIDE P., BURGER E. und FEYEN H. (1986) *Biologically active forms of vitamin D3 in kidney and intestine*. Arch Biochem Biophys **108**: 12–14.
- NORMAN A. und DELUCA H. (1963) *The preparation of  $H^3$ - vitamins  $D_2$  and  $D_3$  and their localization in the rat*. Biochemistry **2**: 1160–1168.
- NORMAN A., LEATHERS V. und BISHOP J. (1983) *Normal egg hatchability requires the simultaneous administration to the hen of 1  $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol and 24R,25-dihydroxycholecalciferol*. J Nutr **113**: 2505–2515.
- NORMAN A., LUND J. und DELUCA H. (1964) *Biologically active forms of vitamin D3 in kidney and intestine*. Arch Biochem Biophys **108**: 12–21.
- NORMAN A., NEMERE I., ZHOU L., BISHOP J., LOWE K., MAIJAR A., COLLINS E., TAOA T., SERGEEV I. und FARACH.CARSON M. (1992) *1,25(OH) $_2$ -vitamin D3, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways*. J Steroid Biochem Mol Biol **41**: 231–240.
- NORMAN A., SONG X., ZANELLO L., BULA C. und OKAMURA W. (1999) *Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$  vitamin D $_3$* . Steroids **64**: 120–128.
- OLSON E. und DELUCA H. (1969) *25-hydroxycholecalciferol: direct effect on calcium transport*. Science **165**: 405–407.
- OLSON W., JORGENSEN N., BRINGE A., SCHULTZ L. und DELUCA H. (1974) *25-hydroxycholecalciferol. III. effect of dosage on soft tissue integrity and vitamin D activity of tissue and milk from dairy cows*. J Dairy Sci **57**: 677–682.
- OLSON W., JORGENSEN N., SCHULTZ L. und DELUCA H. (1973) *25-hydroxycholecalciferol (25-OHD $_3$ ) II. efficacy of parenteral administration in prevention of parturient paresis*. J Dairy Sci **56**: 889–895.
- ORNOY A., GOODWIN D., NOFF D. und EDELSTEIN S. (1978) *24, 25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation*. Nature **276**: 517–519.
- OSBORNE T. und MENDEL L. (1913) *The relation of growth to the chemical constituents of the diet*. J Biol Chem **15**: 311–326.
- OVESEN L., BROTH C. und JAKOBSEN J. (2003) *Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with?*. Ann Nutr Metab **47**: 107–113.

- PALZER A., RITZMANN M., HAFNER A. und HEINRITZI K. (2006) *Vitamin D-Intoxikation bei Sauen*. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere **34**: 224–229.
- PANSU D., DUFLOS C., BELLATON C. und BRONNER F. (1993) *Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats*. J Nutr **123**: 1396–1404.
- PAPESOVA L., FUCIKOVA A., PIPALOVA M. und TUPY P. (2008) *The synergic effect of vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxycholecalciferol/calcidiol in broiler diet*. Scientia Agriculturae Bohemica **39**: 273–277.
- PATENT (2005) *Internationales Patent WO 2005/059565 A2*.
- PEDROZO H., SCHWARTZ Z., RIMES S., SYLVIA V., NEMERE I., POSNER G., DEAN D. und BOYAN B. (1999) *Physiological importance of the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> membrane receptor and evidence for a membrane receptor specific for 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>*. J Bone Miner Res **14**: 856–67.
- PENN G. (1970) *Calciphylactic syndrome in pigs*. Vet Rec **86**: 718–721.
- PEPPER T., BENNETT D., BROWN P. und TAYLOR D. (1978) *Rickets in growing pigs and response treatment*. Vet Rec **103**: 4–8.
- PHADNIS R. und NEMERE I. (2003) *Direct, rapid effects of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on isolated intestinal cells*. J Cell Biochem **90**: 287–293.
- PHILIPPS P., AURELI R., WEBER G. und KLÜNTNER A.M. (2005) *Effects of 25-hydroxycholecalciferol (Hy•D®) at doses from 35 to 560 mug per kg feed on the performance of broiler chickens fed a diet based on maize, wheat and soybean meal*. World Poultry Science Association, 15th European Symposium on Poultry Nutrition, Balatonfüred, Hungary.
- PIKE J. (1984) *Monoclonal antibodies to chick intestinal receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Interaction and effects of binding on receptor function*. J Biol Chem **259**: 1167–1173.
- POMMER G. (1885) *Untersuchungen über Osteomalacie und Rachitis nebst Beiträgen*. Verlag F. C. W. Vogel, Leipzig.
- PONCHON G., KENNAN S. und DELUCA H. (1969) *Activation of vitamin D by the liver*. J Clin Invest **48**: 2032–2037.
- PRICE P. und BAUKOL S. (1981) *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases serum levels of the vitamin K-dependent bone protein*. Biochem Biophys Res Commun **99**: 928–935.
- RAJAKUMAR K. (2003) *Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective*. Pediatrics **112**: 132–135.

- RAMBECK W. (1997) Vitamin D, In: H.-K. Biesalski, J. Schrezenmeir, P. Weber und H. Weiss (Hrsg.), Vitamine: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, 34-40. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- RAMBECK W., WEISER H., MEIER W. und ZUCKER H. (1988) *Synergistic effects of vitamin D metabolites*. Ann Nutr Metab **32**: 108–111.
- RAMBECK W. und ZUCKER H. (1985) *Synergistic effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails*. Biochem Biophys Res Commun **126**: 799–804.
- RAMBECK W.A. (1984) *Vitamin D-artige Verbindungen in der calcinogenen Pflanze Trisetum flavescens (Goldhafer)*. Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, Institut für Physiologie, Physiolog Chemie und Ernährungsphysiologie der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München .
- RASSNICK K., JOHNSON J.M.C., BALKMAN C., RAMNATH N., YU W., ENGLER K., PAGE R. und TRUMP D. (2008) *In vitro and in vivo evaluation of combined calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously occurring tumors*. Cancer Chemother Pharmacol **62**: 881–891.
- REICHEL H., KOEFFLER H. und NORMAN A. (1989) *The role of the vitamin D endocrine system in health and disease*. N Engl J Med **320**: 980–991.
- REICHEL H. und NORMAN A. (1989) *Systemic effects of vitamin D*. Annu Rev Med **40**: 71–78.
- RENNIE J. und WHITEHEAD C. (1996) *Effectiveness of dietary 25- and 1-hydroxycholecalciferol in combating tibial dyschondroplasia in broiler chickens*. Br Poult Sci **37**: 413–421.
- RINGE J., FISCHER M. und WAHNER A. (1994) *Diagnostik des Osteoporoserisikos*. Dtsch Med Wochenschr **119**: 1289–1295.
- ROLAND D.S. und HARMS R. (1976) *The lack of response of 25-hydroxy-vitamin D<sub>3</sub> on egg shell quality or other criteria in laying hens*. Poult Sci **55**: 1982–1985.
- ROMEIS B. und BÖCK P. (2009) Mikroskopische Technik, 18. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- ROSOL T., MERRYMAN J., NOHUTCU R., MCCAULEY L. und CAPEN C. (1991) *Effects of transforming growth factor-alpha on parathyroid hormone- and parathyroid hormone-related*

- protein-mediated bone resorption and adenylate cyclase stimulation in vitro*. Domest Anim Endocrinol **8**: 499–507.
- ROSSOW N., BOLDUAN G. und STAUFENBIEL R. (1994) Stoffwechselstörungen bei Haustieren. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- ROTHER H., HAUSMANN A., CASTEELS K., OKAMURA H., KURIMOTO M., BURKART V., MATHIEU C. und KOLB H. (1999) *IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis*. J Immunol **163**: 1230–1236.
- SACHS M., BAR A., COHEN R., MAZUR Y., MAYER E. und HURWITZ S. (1977) *Use of 1alpha-hydroxycholecalciferol in the prevention of bovine parturient paresis*. Am J Vet Res **38**: 2039–2041.
- SANTOS Y. und SOTO-SALANOVA M. (2005) *Effect of Hy•D® addition on performance and slaughterhouse results of broiler*. World Poultry Science Association, 15th European Symposium on Poultry Nutrition, Balatonfüred, Hungary.
- SCANLON K.S., BLANK S., SINKS T., LETT S., MUELLER P., FREEDMAN D.S., SERDULA M. und FALK H. (1995) *Subclinical health effects in a population exposed to excess vitamin D in milk*. Am J Public Health **85**: 1418–1422.
- SCHNURRBUSCH U. und HEINRITZI K. (2006) Erkrankungen der Harnorgane, In: K. Heinritzi, H.R. Gindele, G. Reiner und U. Schnurrbusch (Hrsg.), Schweinekrankheiten, 1. Auflage, 171-178. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- SCHWARTZ G., WHITLATCH L., CHEN T., LOKESHWAR B. und HOLICK M. (1998) *Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**: 391–395.
- SCHWEIGERT F. (2005) Vitamine, In: W. v. Engelhardt und G. Breves (Hrsg.), Physiologie der Haustiere, 2. Auflage, 614-624. Enke-Verlag, Stuttgart.
- SEO E.G., EINHORN T. und NORMAN A. (1997) *24R,25-dihydroxyvitamin D3: an essential vitamin D3 metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks*. Endocrinology **138**: 3864–3872.
- SERGEEV I. (2004) *Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis*. J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**: 419–425.

- SERGEEV I., ARKHAPCHEV Y. und SPIRICHEV V. (1988) *Ascorbic acid effects on 1-OHase and 24-OHase activity in kidney and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> receptor binding in intestinal mucosa of guinea-pigs*. Vitamin D: molecular, cellular, and clinical endocrinology: Proceedings of the 7th Workshop on Vitamin D, 191–193. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- SHEPARD R. und DELUCA H. (1980) *Plasma concentrations of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D<sub>3</sub> or 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> intakes*. Arch Biochem Biophys **202**: 43–53.
- SHIBATE T., SHIRA-ISHI A., SATO T., MASAKI T., MASUDA A., HISHIYA A., ISHIKURA N., HIGASHI S., UCHIDA Y., SAITO M., ITO M., OGATE E. und WATANABE K. (2002) *Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow*. J Bone Miner Res **17**: 622–629.
- SI-KWANG L. (2002) *Metabolic disease in animals*. Semin Musculoskelet Radiol **6**: 341–343.
- SIMON O. (2008) Vitamine, In: H. Jeroch, W. Drochner und O. Simon (Hrsg.), Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere, 2. Auflage, 87-102. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- SITRIN M. und BENGGOA J. (1987) *Intestinal absorption of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in chronic cholestatic liver disease*. Am J Clin Nutr **46**: 1011–1015.
- SITRIN M., POLLACK K., BOLT M. und ROSENBERG I. (1982) *Comparison of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D absorption in the rat*. Am J Physiol **242**: G326–G332.
- SLEPCHENKO B. und BRONNER F. (2001) *Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry*. Am J Physiol Cell Physiol **281**: C270–C281.
- SMITH E., MACLAUGHLIN J., GANGE W., TAYLOR D. und HOLICK M. (1985) *Cultured psoriatic fibroblasts from involved and uninvolved sites have a partial but not absolute resistance to the proliferation-inhibition activity of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>*. Proc Natl Acad Sci U S A **82**: 5409–5412.
- SNOW I. (1895) *An explanation of the great frequency of rickets among neapolitan children in American cities*. Arch Pediatr **12**: 18–34.
- SOARES J.J., KERR J. und GRAY R. (1995) *25-hydroxycholecalciferol in poultry nutrition*. Poult Sci **74**: 1919–1934.
- SOARES J.J., McLOUGHLIN C., SWERDEL M. und E.BOSSARD (1976) *Effect of hydroxy vitamin D metabolites on the mineralization of egg shell and bones*. 85–92.



- SOOY K., SCHERMERHORN T., NODA M., SURANA M., RHOTEN W., M. MEYER, FLEISCHER N., SHARP G. und CHRISTAKOS S. (1999) *Calbindin-D(28k) controls Ca(2+) and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines.* J Biol Chem **274**: 34343–34349.
- SPIRICHEV V. und SERGEEV I. (1988) *Vitamin D: Experimental research and its practical application.* World Rev Nutr Diet **56**: 173–216.
- STAMP T., HADDAD J. und TWIGG C. (1977) *Comparison of oral 25-hydroxycholecalciferol, vitamin D, and ultraviolet light as determinants of circulating 25-hydroxyvitamin D.* Lancet **1**: 1341–1343.
- STANGL G. (2008) Mineralstoffe, Vitamine und sonstige Wirkstoffe, In: M. Kirchgessner (Hrsg.), Tierernährung, 12. Auflage, 208-216. DLG-Verlag, Frankfurt.
- STEENBOCK H. und BLACK A. (1924) *Fat soluble vitamins. XVII. The induction of growth-promoting and calcifying properties in a ration by exposure to ultraviolet light.* J Biol Chem **61**: 405–422.
- STUMPF W., SAR M., REID F., TANAKA Y. und DELUCA H. (1979) *Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid.* Science **206**: 1188–1190.
- SUDA T., DELUCA H., SCHNOES H. und BLUNT J. (1969) *The isolation and identification of 25-hydroxyergocalciferol.* Biochemistry **8**: 3515–3520.
- SUDA T., DELUCA H. und TANAKA Y. (1970) *Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats.* J Nutr **100**: 1049–1052.
- SUDA T., TAKAHASHI N. und MARTIN T. (1992) *Modulation of osteoclast differentiation.* Endocr Rev **13**: 66–80.
- SUDA T., UENO Y., FUJII K. und SHINKI T. (2003) *Vitamin D and bone.* J Cell Biochem **88**: 259–266.
- SUNDE M. (1975) *What about 25-hydroxycholecalciferol for poultry?.* Proceedings of the Distribution Feed Research Council **30**: 53–62.
- THOMAS M., LLOYD-JONES D., THADHANI R., SHAW A., DERASKA D., KITCH B., VAMVAKAS E., DICK I., PRINCE R. und FINKELSTEIN J. (1998) *Hypovitaminosis D in medical inpatients.* N Engl J Med **338**: 777–783.
- THOMPSON G., LEWIS B. und BOOTH C. (1966) *Absorption of vitamin D3-3H in control subjects and patients with intestinal malabsorption.* J Clin Invest **45**: 94–102.

- THOMPSON K. und ROBINSON B. (1989) *An osteodystrophy apparently caused by vitamin D deficiency in growing pigs*. N Z Vet J **37**: 155–157.
- TIAN X., CHEN T., MATSUOKA L., WORTSMAN J. und HOLICK M. (1994) *Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D<sub>3</sub> in human silk*. J Biol Chem **268**: 14888–14892.
- TRUMMEL C., RAISZ L., BLUNT J. und DELUCA H. (1969) *25-hydroxycholecalciferol: stimulation of bone resorption in tissue culture*. Science **163**: 1450–1451.
- TUCKER G., GAYNON R. und HAUSSLER M. (1973) *Vitamin D 3 -25-hydroxylase: tissue occurrence and apparent lack of regulation*. Arch Biochem Biophys **155**: 47–57.
- UDAGAWA N., TAKAHASHI N., AKATSU T., TANAKA H., SASKI T., NISHIHARA T., KOGA T., MARTIN T. und SUDA T. (1990) *Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 7260–7264.
- VELDE J.V.D., VERMEIDEN J. und BLOOT A. (1985) *Medullary bone matrix formation, mineralization, and remodeling related to the daily egg-laying cycle of Japanese quail: a histological and radiological study*. Bone **6**: 321–327.
- VIETH R. (1990) *The mechanisms of vitamin D toxicity*. Bone Miner **11**: 267–272.
- VIETH R. (1999) *Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety*. Am J Clin Nutr **69**: 842–856.
- VIETH R. (2007) *Vitamin D toxicity, policy, and science*. J Bone Miner Res **22**: V64–V68.
- VIETH R., McCARTEN K. und NORWICH K. (1990) *Role of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> dose in determining rat 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production*. Am J Physiol **258**: E780–E789.
- WALDMANN K.H. und PLONAIT H. (2004) *Erkrankungen der Verdauungsorgane und des Abdomens*, In: K.-H. Waldmann, M. Wendt (Hrsg.), Lehrbuch der Schweinekrankheiten, 4. Auflage, 307-386. Parey-Verlag, Stuttgart.
- WANG Q., YANG W., UYTINGCO M., CHRISTAKOS C. und WIEDER R. (2000) *1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death*. Cancer Res **60**: 2040–2048.
- WASSERMAN R. (1997) *Intestinal calcium-absorption*. Academic Press 259–273.

- WEISER H., SCHLACHTER M. und BACHMANN H. (1988) *The importance of vitamin C for hydroxylation of vitamin D3 to 1 $\alpha$ , 25 (OH) $_2$  D3 and of 24R, 25 (OH) $_2$  D3 to a more active metabolite*. Vitamin D: molecular, cellular, and clinical endocrinology: Proceedings of the 7th Workshop on Vitamin D, 644–653. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- WEISS E. (2007) Harnorgane - Niere, In: E. Dahme und E. Weiss (Hrsg.), Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 6. Auflage, 173-196. Enke-Verlag, Stuttgart.
- WHITEHEAD C., McCORMARCK H., McTEIR L. und FLEMING R. (2004) *High vitamin D3 requirements in broilers for bone quality and prevention of tibial dyschondroplasia and interactions with dietary calcium, available phosphorus and Vitamin A*. Br Poult Sci **45**: 425–436.
- WINDAUS A., SCHENCK F. und WERDER F. (1936) *Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-cholesterin*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem **241**: 100–103.
- WINTER M., MORAVA E., SIMON G. und GYÜRE A. (1972) *The effect of vitamin D 3 and 25-hydroxycholecalciferol on intestinal transport of calcium in vivo and in vitro*. Experientia **28**: 659–660.
- WITHOLD W., SCHULTE U. und REINAUER H. (1996) *Method for determination of bone alkaline phosphatase activity: analytical performance and clinical usefulness in patients with metabolic and malignant bone diseases*. Clin Chem **42**: 210–217.
- WONDRA K., HANCOCK J., BEHNKE K., HINES R. und STARK C. (1995) *Effects of particle size and pelleting on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs*. J Anim Sci **73**: 757–763.
- YAMAMOTO T., OZONO K., SHIMA M., YAMAOKA K. und OKADA S. (1998) *24R,25-dihydroxyvitamin D3 increases cyclic GMP contents, leading to an enhancement of osteocalcin synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in cultured human osteoblastic cells*. Exp Cell Res **244**: 71–76.
- YANNAKOPOULOS A. und MORRIS T. (1979) *Effect of light, vitamin D and dietary phosphorus on egg-shell quality late in the pullet laying year*. Br Poult Sci **20**: 337–342.
- YARGER J., QUARLES C., HOLLIS B. und GRAY R. (1995 b) *Safety of 25-hydroxycholecalciferol as a source of cholecalciferol in poultry rations*. Poult Sci **74**: 1437–1446.
- YARGER J., SAUNDERS C., McNAUGHTON J., QUARLES C., HOLLIS B. und GRAY R. (1995 a) *Comparison of dietary 25-hydroxycholecalciferol and cholecalciferol in broiler chickens*. Poult Sci **74**: 1159–1167.

- YOSHIMOTO Y. und NORMAN A. (1986) *Biological activity of vitamin D metabolites and analogs: dose-response study of  $^{45}\text{Ca}$  transport in an isolated chick duodenum perfusion system.* J Steroid Biochem **25**: 905–909.
- ZEHNDER D. und HEWISON M. (1999) *The renal function of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase.* Mol Cell Endocrinol **151**: 213–220.
- ZELLA J. und DELUCA H. (2003) *Vitamin D and autoimmune diabetes.* J Cell Biochem **88**: 216–222.
- ZENTEK J. und MISCHOK D. (1997) *Verminderte Futteraufnahme bei Schweinen.* Dtsch Tierarztl Wochenschr **104**: 36–37.
- ZEPPERITZ H. (1994) *Untersuchungen zur Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der Gebärpause des Rindes unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens des ionisierten Calciums im Blut und des Einsatzes von Vitamin D<sub>3</sub> und 25- bzw. 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol.* Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig .
- ZEPPERITZ H. und SCHWABE H. (1993) *Zur Wirkung parenteral appliziertem 25-Hydroxycholecalciferol und 1 $\alpha$ -Hydroxycholecalciferol auf die Mineralstoffkonzentrationen im Blutplasma von hochträchtigen Kühen.* Berl Munch Tierarztl Wochenschr **106**: 183–188.
- ZIEROLD C., MINGS J. und DELUCA H. (2003) *Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and parathyroid hormone.* J Cell Biochem **88**: 234–237.
- ZUCKER H. und RAMBECK W.A. (1981) *Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub>-metabolitartige Aktivität in *Trisetum flavescens*.* Zentralbl Veterinarmed A **28**: 436–441.

# Tabellenverzeichnis

2.1 Richtwerte für Nährstoffgehalte in der Schweinefütterung pro Tier und Tag [T=Tier, F=Futter] (KAMPHUES et al., 2009) . . . . .	35
3.1 Zusammensetzung des Grundfuttermittels . . . . .	51
3.2 Aufteilung der vier Gruppen: Kontrollgruppe (T1) und drei Versuchsgruppen (T2, T3, T4) mit der empfohlenen Dosis (1x), der Zwischendosis (5x) und der hohen Dosis (10x) von 25(OH)D <sub>3</sub> . . . . .	52
4.1 Gesamte Futteraufnahme über den Versuchszeitraum von 42 Tagen und durch- schnittliche tägliche Futteraufnahme (pro Tier) . . . . .	89
4.2 Mittlere Körpermasse [kg] (MW±SD) der Tiere im Versuchsverlauf . . . . .	89
4.3 Durchschnittliche Gesamtzunahmen im Versuchszeitraum (Tag 0-42), durch- schnittliche tägliche Zunahmen und Futterverwertung (MW±SD) pro Tier in den Versuchsgruppen . . . . .	90
4.4 Masse der Organe Herz, Lunge und Leber (MW±SD) in den Versuchsgruppen .	91
4.5 Masse der Organe Milz, rechte und linke Niere (MW±SD) in den Versuchsgruppen	92
4.6 Makroskopische Befunde aller Tiergruppen . . . . .	93
4.7 Makroskopische Befunde aller Tiergruppen . . . . .	93
4.8 Makroskopische und histologische Befunde der Tiergruppen T2 und T4 . . . . .	94
4.9 Erythrozyten- , Leukozyten- und Thrombozytenzahl (MW±SD) in den Versuchs- gruppen . . . . .	95
4.10 Hämoglobingehalt und Hämatokritwert (MW±SD) in den Versuchsgruppen . . .	96
4.11 MCV- , MCH- und MCHC-Werte (MW±SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	97
4.12 Lymphozyten, Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten (MW±SD) im Serum der Versuchsgruppen . . . . .	97
4.13 Metamyelozyten, stabkernige neutrophile Granulozyten und segmentkernige neutrophile Granulozyten (MW±SD) im Serum der Versuchsgruppen . . . . .	98
4.14 Aspartat-Amino-Transferase (AST), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) (MW±SD) im Serum der Versuchsgruppen .	99

4.15 Alkalische Phosphatase (AP) und knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen . . . . .	100
4.16 Glucose, Harnstoff und Kreatinin (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen . . .	101
4.17 Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß und Albumin (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen . . . . .	101
4.18 Natrium, Kalium und Chlorid (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen . . . . .	102
4.19 Phosphor und Gesamtcalcium (MW $\pm$ SD) im Serum der Versuchsgruppen . . . . .	103
4.20 25-Hydroxycholecalciferolgehalt im Plasma (MW $\pm$ SD) der Versuchsgruppen . . .	104
4.21 Absolute Länge der Knochen und relative Länge der Knochen bezogen auf 10 kg Körpermasse (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	105
4.22 Absoluter Durchmesser der Knochen und relativer Durchmesser der Knochen bezogen auf 10 kg Körpermasse (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	106
4.23 Absolute Masse der Knochen und relativer Durchmesser der Knochen bezogen auf 10 kg Körpermasse (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	107
4.24 Bruchlast $F_{max}$ und Dehnung $\epsilon_{Fmax}$ der Knochen (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	108
4.25 Aschegehalt der Knochen bezogen auf US und nicht fettfreie TS (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	109
4.26 Calcium- und Phosphorgehalt der Knochen (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . .	109
4.27 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Fett- und Hautgewebe (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen, max. angenommener Wert 19,44 ng/g für T1 und T2 (LLQ <sub>Fett,Haut</sub> 20 ng/g) . . . . .	111
4.28 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Muskel- und Lebergewebe (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen, max. angenommener Wert 4,44 bzw. 9,44 ng/g für T1 und z.T. T2 (LLQ <sub>Muskel</sub> 5 ng/g; LLQ <sub>Leber</sub> 10 ng/g) . . . . .	112
4.29 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Nierengewebe (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen, max. angenommener Wert 9,44 ng/g für T1 (LLQ <sub>Niere</sub> 10 ng/g) . . . . .	113
4.30 Trockensubstanzgehalt der Nieren (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	114
4.31 Aschegehalt der Nieren bezogen auf US und TS (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	115
4.32 Calciumgehalt der Nieren (MW $\pm$ SD) in den Versuchsgruppen . . . . .	115
4.33 pH-Wert und spezifisches Gewicht (MW $\pm$ SD) im Urin in den Versuchsgruppen . . .	117
4.34 Calcium-Kreatinin-Quotient und Phosphor-Kreatinin-Quotient (MW $\pm$ SD) im Urin der Tiere in den Versuchsgruppen . . . . .	119
4.35 Nährstoffgehalte im Futter der Versuchsgruppen nach Weender-Analyse . . . . .	120
4.36 Stärke- und Gesamtzuckergehalt sowie Energiegehalt im Futter der Versuchsgruppen . . . . .	121

4.37 Gehalt an Calcium, Phosphor und Natrium im Futter der Versuchgruppen . . . .	121
4.38 Erwarteter und tatsächlich ermittelter Vitamin D <sub>3</sub> - und 25-Hydroxycholecalciferolgehalt pro kg Futter der verschiedenen Gruppen . . . .	122

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Photochemische und metabolische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol zu 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (KOLB, 1998) . . . . .	17
2.2	Läuferschweine mit Rachitis und gesunden Wurfgeschwistern im Alter von 14 Wochen (LAHRMANN und PLONAIT, 2004) . . . . .	34
5.1	Entwicklung der durchschnittlichen Körpermassen der Tiere (MW±SD) in den Versuchsgruppen im Versuchszeitraum [T1: 2000 <i>I.E.</i> Vitamin D <sub>3</sub> , T2: 0,05 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (10x)] . . . .	129
5.2	Durchschnittliche Futterverwertung der Tiere (MW±SD) in den Versuchsgruppen im Versuchszeitraum [T1: 2000 <i>I.E.</i> Vitamin D <sub>3</sub> , T2: 0,05 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (10x)] . . . . .	130
5.3	Durchschnittlicher 25-Hydroxycholecalciferolgehalt (MW±SD) im Plasma der Versuchsgruppen [T1: 2000 <i>I.E.</i> Vitamin D <sub>3</sub> , T2: 0,05 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (10x)] . . . . .	137
5.4	Durchschnittliche Bruchlast der Knochen (MW±SD) in den Versuchsgruppen [T1: 2000 <i>I.E.</i> Vitamin D <sub>3</sub> , T2: 0,05 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (10x)] . . . . .	139
5.5	Durchschnittliche Dehnung der Knochen (MW±SD) in den Versuchsgruppen bis zum Zeitpunkt des Brechens [T1: 2000 <i>I.E.</i> Vitamin D <sub>3</sub> , T2: 0,05 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (10x)] . . . . .	140
5.6	Durchschnittlicher 25-Hydroxycholecalciferolgehalt der Organe (MW±SD) in den Versuchsgruppen [T1: 2000 <i>I.E.</i> Vitamin D <sub>3</sub> , T2: 0,05 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (1x), T3: 0,25 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (5x), T4: 0,50 <i>mg</i> 25(OH)D <sub>3</sub> (10x)] . . . . .	141



# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. A. Rambeck für die Überlassung des Themas bedanken. Dank sagen möchte ich ihm außerdem für die aufmerksame Betreuung und wohlwollende Unterstützung in allen Phasen der Doktorarbeit. Nicht nur fachlich, sondern auch menschlich fühlte ich mich bei ihm immer gut aufgehoben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Sylvia Juliane von Rosenberg, deren unermüdliche Hilfsbereitschaft und engagierte Unterstützung sehr zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Ihre Menschlichkeit und ihr frohes Gemüt haben es immer wieder geschafft, mich auf ein Neues zu motivieren.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Ulrich Wehr, der im Vorfeld und Anfangsstadium dieser Studie viel für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit getan hat.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter und Tierpfleger der Außenstelle Oberwiesenfeld für die Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre während der Versuchsdurchführung, besonders Frau Elisabeth Stadler, Herrn Adrian Frille, Herrn Michael Gerstlauer und Herrn Steffen Mitschke.

Auch beim Laborpersonal des Lehrstuhles für Tierernährung und Diätetik möchte ich mich herzlich bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hier Herrn Werner Hesselbacher, Frau Elke Kleiner, Frau Antje Wetzels und die immer hilfsbereiten und freundlichen Auszubildenden, die sowohl fachlich, als auch privat immer ein offenes Ohr hatten.

Danken möchte ich auch der Firma DSM Nutritional Products Ltd (Research & Development, Analytical Research Center, CH-4002 Basel), besonders Herrn Gilbert Weber, für die Ermöglichung dieser Dissertation, die bereitgestellten Futtermittel und die durchgeführten Untersuchungen.

Ein großer Dank geht an die Klinik für Schweine der LMU München, deren Unterstützung vor, während, und nach der Versuchszeit einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Tierpathologie der LMU München bedanke ich mich herzlich für den reibungslosen und tatkräftigen Ablauf der Tieruntersuchungen und die freundliche Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der Klinik für Wiederkäuer und die Mitarbeiter des Lehrstuhles für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie für die geleisteten Untersuchungen.

Vielen Dank an den Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene des Veterinärwissenschaftlichen Departments der LMU München, unter anderem für die Bereitstellung und Einführung in die Material-Prüfmaschine durch Herrn Dr. Frank Ahrens.

Den Mitarbeitern der Rechnerbetriebsgruppe der LMU München, allen voran Herrn Chris van der Meijden, sowie Herrn Martin Härtner möchte ich für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung rund um LaTeX und die anfallenden Computerfragen danken.

Meinen Eltern, Karin, Danny, Sylvie und Herrn Prof. Dr. W. A. Rambeck möchte ich herzlich für ihr konstruktives und wertvolles Korrekturlesen danken.

Ein ganz großer Dank geht an alle meine Freunde, die mich während dieser turbulenten Zeit begleitet und immer wieder motiviert und unterstützt haben.

Lieben Dank an Daniela Schiele für ihre Hilfe bei der englischen Übersetzung.

Bei Marcus bedanke ich mich von ganzem Herzen für seine Geduld, seine Motivation, sein Verständnis und seine Zuneigung in dieser nicht immer leichten Zeit. Seine Unterstützung hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung mein Studium, sowie die Durchführung meiner Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Danke für das in mich gesetzte Vertrauen, die große Anerkennung dieser Arbeit und insbesondere die Geduld.

# Lebenslauf

## Andrea Erhardt

04.04.1981      Geboren in Ulm/Donau  
als Tochter von  
Manfred Erhardt (Kaufmännischer Angestellter) und  
Hildegard Erhardt, geb. Thierer (Fernmeldehauptsekretärin)

**Geschwister**      Martina Erhardt, Michael Erhardt und Julia Erhardt

### Schulbildung

1987-1991      Gutenberg-Grundschule Ulm-Jungingen  
1991-2000      Kepler-Gymnasium Ulm  
21.06.2000      Abitur

### Ausbildung

1997-2000      Ausbildung zur nebenberuflichen C-Kirchenmusikerin  
16.10.2000      Prüfung durch Landeskirchenmusikdirektor Baur

### Bürgerschaftliches Engagement

2000-2001      Teilnahme an einem Freiwilligen Ökologischen Jahr (FÖJ)  
Einsatzstelle: Verein für Pflanzenzucht auf dem biologisch-dynamischen  
Hof Grub (Gars am Inn)  
Position innerhalb des FÖJs: Gruppensprecherin und Bundesdelegierte

## **Studium**

2001-2007            Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
01.06.2007            Approbation als Tierärztin

## **Promotion**

04.2007-04.2009    Anfertigung vorliegender Dissertation  
                          am Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik  
                          Veterinärwissenschaftliches Department  
                          der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Berufserfahrung**

seit 01.06.2008      Assistenztierärztin in der Gemeinschaftspraxis  
                          Dr. med. vet. Stefan Birk und Daniela Braun  
                          Bökeler 4, 89597 Hausen am Bussen